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

**Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida
de *Candida viswanathii***

ALEX FERNANDO DE ALMEIDA

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

Junho - 2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



**Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida
de *Candida viswanathii***

ALEX FERNANDO DE ALMEIDA

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo

Co-orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

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

Junho - 2012

547.758 Almeida, Alex Fernando
A447p Produção, purificação e propriedades bioquímicas de
lipase ácida de *Candida viswanathii* / Alex Fernando Almeida.
- Rio Claro : [s.n.], 2012
212 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Sâmia Maria Tauk Tornisielo
Co-Orientador: Eleonora Cano Carmona

1. Enzimas. 2. Triacilglicerol acil hidrolase. 3.
Imobilização de enzima. 4. Caracterização de enzima. I.
Título.

Dedico
este trabalho à minha família
pelo amor, carinho, apoio e fortaleza

Observei outra coisa debaixo do sol:

Não é o mais veloz que ganha a corrida, nem o mais forte que vence na batalha. O pão não é para os mais sábios, nem as riquezas para os mais inteligentes, nem o favor para os mais cultos, porque tudo depende do tempo e do acaso.

(Eclesiastes 9, 11).

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que na sua infinita bondade e sabedoria, concedeu todos os meios necessários para que este trabalho fosse realizado. Agradeço pelos seus ensinamentos íntimos à minha alma, instruindo-me a ter paciência nos momentos de tribulações, a não deixar o barco e esperar sempre Nele, para que Nele eu encontrasse o descanso e o meu destino.

À Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo pela orientação, confiança, dedicação, amizade e carinho durante todos estes anos de convivência.

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona pela co-orientação, dedicação e ensinamentos durante todo o trabalho.

À Profa. Dra. Rosa dos Prazeres Melo Furriel Inocentes, do Departamento de Química, FFCRLRP/USP, pelas sugestões, colaboração e auxílio em várias etapas de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, do Departamento de Biologia, FFCRLRP/USP, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis, pelo auxílio durante o período sem bolsa de estudos e por ceder a linhagem de *Candida viswanathii* para este estudo.

À Profa. Dra. Valéria Marta Gomes de Lima, do Departamento de Ciências Biológicas, UNESP, campus de Assis, pela metodologia de determinação de atividade lipase por titulação.

Ao Prof. Dr. César Rafael Franchini Terrasan, pelas leituras dos textos, sugestões e ajuda no laboratório com gratuidade e atenção.

Ao Centro de Estudos Ambientais e ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia por ceder os laboratórios para a realização dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada, UNESP e seus coordenadores Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e Sandra Mara Martins Franchetti.

Às técnicas de laboratório Eleni, Francisca e Amanda, do Centro de Estudos Ambientais pela amizade e assistência técnica.

À Carmen Silva Casonato de Souza pela assistência técnica, paciência e amizade durante o trabalho.

Ao Anderson Rodrigues, técnico do Departamento de Biologia, pela sua contribuição com os géis de eletroforese.

Às empresas cervejaria Baungartner pela doação do bagaço de cevada, Nestlé pela doação de material de coleta de micro-organismos e Frigorífico Fricock pela doação da gordura de frango.

Aos funcionários do Centro de Estudos Ambientais-CEA, Jorbson, Reginaldo, Jorge, Marcos pelos momentos de descontração.

À Sara Cristina Galvão (*in memoriam*) por toda sua contribuição neste trabalho, momentos de descontração e atenção e que agora nos deixa a saudade da convivência e a alegria de podermos ter conhecido alguém que se doou sem pedir algo em troca.

À Ana Carolina Cerri da Silva por toda ajuda e paciência dispensada durante o trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, da Biblioteca e aos demais docentes e colegas que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos do Mestrado, Doutorado, Iniciação Científica e estágio do Departamento de Bioquímica e Microbiologia.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica de Micro-organismos Adriana Knob, Beatriz Temer, Cárol C. Terrone, Daniela Turati, Danielle B. Pedrolli e Fabiana C. F. Novaes.

Ao Ministério de Música Católica Luz Divina pelos momentos de oração, partilha e convívio.

Ao Fabrício Coutinho de Paula pela amizade, convivência e as conversas produtivas durante estes anos de convívio.

Aos amigos Sidnei Kuerten, Aguinaldo Silva, Fabrício Corradini, Frederico Gradela e César F. Terrasan, e Marcela Satow (eterna agregada), pelos anos de convivência na república do Genáro. Levaremos em nossa memória momentos inesquecíveis que não foram registrados em fotografias ou filmes, mas que serão lembrados quando nos encontrarmos com muita alegria e saudade dos velhos tempos.

À minha noiva Erika Carolina Vieira que me acompanhou durante todo o trabalho. Acolheu-me em seus braços com amor e ternura. Soube esperar e abdicar de suas vontades durante os quatro anos de trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

*A todos meu
Muito Obrigado*

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Abreviações.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	23
Capítulo 1. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
1 Lipases: definição e mecanismo de ação.....	25
2 Métodos para seleção de novas fontes de lipase.....	34
3 Produção de lipases microbianas.....	36
3.1 Fermentação submersa.....	36
3.2 Fermentação em substrato sólido.....	37
3.3 Fatores nutricionais.....	39
4 Purificação de lipases microbianas.....	40
5. Imobilização de lipases microbianas.....	44
6 Caracterização de lipases microbianas.....	48
6.1. Agregação de lipases.....	48
6.1 Propriedades bioquímicas de lipases microbianas.....	49
7 Aplicações de lipases microbianas.....	53
8 Fontes produtoras de lipases.....	56
9 <i>Candida viswanathii</i> : descrição, fisiologia e aplicações biotecnológicas.....	58
10 Referências.....	59

CAPÍTULO 2: Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated <i>Candida viswanathii</i> strain.....	79
CAPÍTULO 3: Production and biochemical properties of a new extracellular acid lipase from <i>Candida viswanathii</i>	108
CAPÍTULO 4: Produção de lipase ácida de <i>Candida viswanathii</i> por fermentação sólida em subprodutos agroindustriais e propriedades da enzima.....	137
CAPÍTULO 5: Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de uma lipase ácida de <i>Candida viswanathii</i>	167
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	211

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Purificação de lipases microbianas	42
Tabela 2. Propriedades bioquímicas gerais de lipases microbianas	51
Tabela 3. Novas linhagens de micro-organismos produtoras de lipases	57

Capítulo 2

Table 1. Total microorganisms selected for screening of lipase producers.	99
Table 2. Evaluation of lipase production from selected filamentous fungi and yeasts.	100
Table 3. Lipase production and growth of <i>Candida viswanathii</i> in different pure carbon sources.	101
Table 4. Lipase production and growth of <i>Candida viswanathii</i> in different natural mixtures of triacylglycerols.	102
Table 5. Lipase production and growth of <i>Candida viswanathii</i> with different nitrogen sources.	103
Table 6. Effect of olive oil concentrations in lipase production by <i>C. viswanathii</i> in ammonium nitrate and yeast extract.	104
Table 7. Parameters of the fermentation for lipase production by <i>C. viswanathii</i> using 1.5% (w/v) olive oil, 0.2% (w/v) yeast extract, 180 rpm and at 28 °C.	105

Capítulo 3

Table 1. Analysis of the lipase production parameters by <i>C. viswanathii</i> after 72 h of cultivation.	126
Table 2. Effect of culture pH on growth and lipase production by <i>C. viswanathii</i>	127
Table 3. Effect of the emulsifiers on growth and lipase production by <i>C.</i>	128

viswanathii.

Table 4. Effect of organic solvents on lipase activity produced by *C. viswanathii*. 129

Table 5. Effect of substances on *Candida viswanathii* lipase stability 130

Capítulo 4

Tabela 1. Produção de lipase ácida por *C. viswanathii* em substrato sólido. 146

Tabela 2. Fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica utilizadas para a produção de lipase por *C. viswanathii*. 152

Tabela 3. Efeito da temperatura sobre a produção de lipase e atividade específica de *C. viswanathii*. 155

Capítulo 5

Tabela 1. Purificação da lipase produzida por *C. viswanathii*. 180

Tabela 2. Imobilização da lipase de *C. viswanathii* em octil Sepharose. 181

Tabela 3. Efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. 191

Tabela 4. Efeito de substâncias sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. 193

Tabela 5. Efeito de solventes orgânicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada. 196

Tabela 6. Constantes cinéticas da lipase livre purificada de *C. viswanathii*. 200

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Hidrólise sequencial de um triacilglicerol típico por uma triacilglicerol acil hidrolases. 25
- Figura 2.** Reações catalisadas por triacilglicerol acil hidrolases (PAQUES e MACEDO, 2006). 26
- Figura 3.** Estrutura completa de uma cadeia polipeptídica da lipase A de *Candida antarctica* (CalA), pertencente à família α/β -hidrolase. α -Hélices estão indicadas por retângulos e folhas β estão indicadas por setas, começando com azul na extremidade *N*-terminal (N) e finalizando com vermelho na extremidade *C*-terminal (C). Os resíduos do sítio ativo Ser184, Asp334 e His366 são representados com estrelas pretas em **B**, e uma molécula de polietilenoglicol está representada por um modelo de preenchimento de espaço em **A** (ERICSSON et al., 2008) 27
- Figura 4.** Mecanismo de reação de lipases (JAEGER et al., 1999). 28
- Figura 5.** Atividade catalítica de lipase em função da concentração de substrato (modificado de SARDA e DESNUELE, 1958). A atividade lipase é quase nula quando o substrato está solúvel em baixa concentração, ocorrendo um aumento da atividade quando a concentração micelar crítica (CMC) é ultrapassada. 30
- Figura 6.** Modelo para a ligação interfacial e ativação da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. (**A**) lipase em solução está na forma fechada (inativa), com a tampa (preto) cobrindo o sítio ativo; (**B**) ligação da lipase à pequenas vesículas unilamelares de lipídeos aniônicos, promovendo deslocamento da tampa e expondo uma grande cavidade hidrofóbica em torno do sítio ativo que interage com a interface lipídica, estabilizando a forma aberta (ativa); (**C**) o substrato particionado (mostrado em cinza) pode então acessar a tríade catalítica (CAJAL et al., 2000).. 31
- Figura 7.** Simulação do movimento da tampa da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. **A**) conformação aberta mostrando resíduos da cavidade do sítio ativo em amarelo, e resíduos das tampas em vermelho (tampa 1) e azul (tampa 2). **B**) 32

conformação fechada mostrando as tampas sobre o sítio ativo da enzima (CHERUKUVADA et al., 2005).

Figura 8. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3-específica (PAQUES e MACEDO, 2006). 33

Figura 9. Reação de hidrólise do *p*-nitrofenil palmitato catalisada por lipases. 35

Figura 10. Representação da adsorção específica de lipases sobre uma matriz contendo lipase imobilizada (Adaptado de VOLPATO et al., 2010). 41

Figura 11. Estratégias de imobilização de enzimas: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) ligação, (D) auto-imobilização (Adaptado de Brady e Jordan, 2009). 45

Figura 12. Células de *Candida viswanathii* (A) cultivadas por três dias em extrato de malte a 27 °C e (B) pseudomicélio desenvolvido em meio batata dextrose ágar (SANDHU e RANDAWA, 1962). 58

Capítulo 2

Figure 1. Hydrolytic activity of *C. viswanathii* lipase on different triacylglycerols. Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium with 2% (w/v) olive oil, pH 6.0, 72 h, 180 rpm at 28 °C. 106

Figure 2. Time-course of lipase production (A), growth and residual olive oil (B) by *C. viswanathii*. Legend: (□) lipase activity, (■) specific activity, (●) biomass, (○) olive oil residual. Culture conditions: Vogel's medium, 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract, pH 6.0 at 28°C, 180 rpm. 107

Capítulo 3

Figure 1. Effect of the agitation speeds in orbital shake on lipase production (A), specific activity (B) and *Candida viswanathii* growth (C). Culture conditions: liquid cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract, at pH 6.0 and 28 °C. (■) 150 rpm; (●) 180 rpm; (▲) 210 rpm. 131

Figure 2. Effect of temperature on growth and lipase production by *C. viswanathii*. Culture conditions: cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil, and 0.2% (w/v) yeast extract, in shaking conditions (210 rpm), at pH 6.0. (■) Lipase activity, (□) Specific activity, (●) biomass. 132

Figure 3. Optimal pH and pH stability of the crude *C. viswanathii* lipase. Assays conditions: 0.05 M glycine-HCl buffer from 2.0 to 3.0 and McIlvaine buffer from 3.0 to 8.0. Lipase activity assays were carried out at 37 °C (a) and in McIlvaine buffer pH 3.5, at 37 °C (b). 133

Figure 4. Optimal temperature and thermal stability of the crude *C. viswanathii* lipase. Assays conditions: McIlvaine buffer pH 3.5 (a). The enzymatic preparation was incubated at (■) 40, (●) 45 and (▲) 50 °C, without substrate. The residual lipase activity was assayed with McIlvaine buffer, pH 3.5, at 40 °C (b) 134

Figure 5. Effect of surfactants on lipase activity produced by *C. viswanathii*. (■) Triton X-100; (▼) Tween 20;(♦) Tween 80; (●) Arabic gum. Assay conditions: lipase activities were assayed on pNPP hydrolysis using McIlvaine buffer pH 3.5, at 40 °C. 135

Figure 6. Hydrolysis of triacylglycerols by crude *Candida viswanathii* lipase. Assays conditions: Triacylglycerols hydrolysis were carried out in McIlvaine buffer pH 4.0 with 5% (w/v) Triton X-100 and hydrolysis activities were assayed by titration method. 136

Capítulo 4

Figura 1. Cinética da produção de lipase por *Candida viswanathii* em fermentação em substrato sólido. Cultivos foram realizados por 10 dias, 28 °C. O inóculo foi preparado em fermentação submersa por 24 horas, 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% (m/v) de solução de sais Vogel sem fonte de nitrogênio e 25% de azeite de oliva. 148

Figura 2. Triacilgliceróis utilizados para a produção de lipase por *C.* 150

viswanathii. Cultivos foram realizados com farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1) por 5 dias, a 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% (m/v) de solução de sais Vogel sem fonte de nitrogênio e 25% de diferentes triacilgliceróis.

Figura 3. Concentração de gordura de frango sobre a produção de lipase por *C. viswanathii*. Cultivos foram realizados com farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1) por 5 dias, a 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% (m/v) de solução de sais Vogel sem fonte de nitrogênio. 151

Figura 4. Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de lipase e atividade específica por *C. viswanathii*. Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada maltado (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, umidade 50%, por cinco dias, a 28 °C. 154

Figura 5. Efeito da umidade do meio de cultivo sobre a produção de lipase e atividade específica de *C. viswanathii*. Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada maltado (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, 3,5% (m/m) de extrato de levedura, umidade 50%, por cinco dias, a 30 °C. 157

Figura 6. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade da lipase ácida produzida por *C. viswanathii* em fermentação em substrato sólido. Condições de ensaio: em (A), atividade enzimática realizada nos tampões: pH 2,0 – 3,0 tampão glicina HCl 0,05 M, pH 3,0 – 8,0 tampão McIlvaine, pH 8,0 – 9,0 tampão Tris-HCl 0,05 M., a 40 °C; em (B), as atividades foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0. 158

Figura 7. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a estabilidade da lipase ácida produzida por *C. viswanathii* em fermentação em substrato sólido. Condições de ensaio: em (A), pH 2,0 – 2,5 tampão glicina HCl 0,05 M, pH 3,0 – 8,0 tampão McIlvaine, pH 8,5 - 9,0 tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9,5 – 10 tampão glicina-NaOH 0,05 M; em (B), a enzima foi diluída em tampão Mcilvaine pH 5,0. As atividades foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0, a 50 °C. 160

Capítulo 5

- Figura 1.** Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *C. viswanathii* em cromatografia de interação hidrofóbica com Octil Sepharose 4 Fast Flow equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 5,9. (■) A₂₈₀; (○) atividade lipase (U/mL); (—) gradiente de Triton X-100; flechas indicam as frações reunidas. 179
- Figura 2.** Perfil eletroforético em SDS-PAGE (10%) da lipase de *C. viswanathii*. Coluna 1: α -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e fosforilase b (97 kDa). 180
- Figura 3.** Reutilização da lipase de *C. viswanathii* imobilizada em suporte octil Sepharose. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3,5 a 40 °C. 182
- Figura 4.** Efeito do pH sobre a atividade (A) e estabilidade (B) da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. (A) A atividade foi determinada em tampão glicina NaOH 0,05 M para a faixa de pH de 2,0 a 3,0 e tampão McIlvaine de 3,0 a 8,0, a 40 °C. (B) A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 36,0 U/mg prot. para a enzima livre e 38,0 U/mg prot. para a enzima imobilizada. 185
- Figura 5.** Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0. A atividade controle (100%) correspondeu a 36,0 U/mg prot. para a enzima livre e 38,0 U/mg prot. para a enzima imobilizada. 187
- Figura 6.** Termoestabilidade da lipase livre (A) e imobilizada (B) de *C. viswanathii*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 72,1 U/mg prot. para a enzima livre e 73,7 U/mg prot. para a enzima imobilizada. 189
- Figura 7.** Especificidade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii* sobre diferentes substratos ésteres de ácidos graxos de *p*-nitrofenila. Ésteres de *p*-nitrofenil foram utilizados na concentração final de 0,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0. A atividade foi determinada em tampão Mcilvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 15 U/mg prot. para a enzima 198

livre e 13 U/mg prot. para a enzima imobilizada. Legenda: C2 acetato, C4 butirato, C8 caproato, C10 decanoato, C12 laurato, C14 miristato, C16 palmitado, C18 estearato.

Figura 8. Cinética enzimática das lipases livre (A) e imobilizada (B) de *C. viswanathii* em *p*-nitrofenil palmitato. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

199

ABREVIATURAS

BC: bagaço de cevada

C2: *p*-nitrofenil acetato

C4: *p*-nitrofenil butirato

C8: *p*-nitrofenil caproato

C10: *p*-nitrofenil decanoato

C12: *p*-nitrofenil laurato

C14: *p*-nitrofenil miristato

C16: *p*-nitrofenil palmitado

C18: *p*-nitrofenil estearato.

CA: casca de arroz

CM: carboximetil

DEAE: dietilaminoetil

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: 1,4-ditiotreitol

E.C: Enzyme Commission

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FSm: fermentação submersa

FSS: fermentação em substrato sólido

FT: farelo de trigo

HCl: ácido clorídrico

k_{cat} : número de renovação

kDa: kilo Daltons

K_m : Constante de Michaelis-Menten

L: maximum lipase activity (U);

OECD: Organization for Economic Co-operation and Development

mM: milimolar

pI: ponto isoelétrico

P_L : produtividade de lipase (U/h);

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

*p*NP: para-nitrofenol

*p*NPP: para-nitrofenil palmitato

P+O: óleo de palma e azeite de oliva

P_X : produtividade de biomassa (g/h);

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

S: substrato (g/L);

STR: reator com tanque agitado

U: unidade enzimática

Y_{X/S_0} : rendimento biomassa sobre substrato não consumido (g/g);

Y_{L/S_0} : rendimento lipase sobre substrato não consumido (U/g);

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

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

TAG: triacilglicerol

$T_{1/2}$: meia vida

T_{50} : meia vida

V_{max} : velocidade máxima

X: biomassa (g/L);

RESUMO

Lipases são enzimas amplamente distribuídas nos seres vivos e apresentam a função biológica de hidrolisar ligações ésteres de triacilgliceróis, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Dependendo da atividade de água estas enzimas catalisam outras reações como esterificação, transesterificação, aminólise e lactonização, importantes em diversas aplicações biotecnológicas dessas enzimas. Neste trabalho, uma linhagem de *Candida viswanathii* foi selecionada, entre outras noventa linhagens de fungos filamentosos e leveduras, como produtora de lipase e suas condições de cultivo foram estudadas em cultivos submersos e em substratos sólido, visando o aumento da produção da enzima. Outro objetivo deste trabalho também foi purificar, imobilizar e caracterizar a lipase produzida nas condições estabelecidas em cultivos submersos. Os resultados obtidos nos cultivos submersos indicaram que, entre as substâncias puras testadas, trioleína e ácido oléico foram os melhores indutores da atividade lipase. Contudo, as melhores condições de cultivo e produção de lipase foram alcançadas utilizando azeite de oliva 1,5% (m/v), extrato de levedura 0,2% (m/v), agitação de 210 rpm, pH 6,0, temperatura de 27,5 °C, após 72 h de cultivo (biomassa 19,0 g/L; atividade 100 U). A adição de 0,1% (m/v) de lecitina de soja aumentou em 1,5 vezes a produção de lipase (147,5 U). A caracterização bioquímica da lipase do caldo fermentado revelou que se tratava de uma lipase ácida com pH ótimo de 3,5, propriedade descrita pela primeira vez para uma lipase do gênero *Candida*. A temperatura ótima foi de 40 °C. Esta enzima bruta mostrou-se altamente estável na faixa de pH 4,0 a 5,0 e na temperatura de 40 °C após 24 h (100%). Nos cultivos sólidos usando resíduos agroindustriais como substrato, a maior produção de lipase foi obtida em meio contendo farelo de trigo e bagaço de cevada (1:1), gordura de frango 40% (m/m), extrato de levedura 3,5% (m/m), temperatura de 30 °C e umidade de 40%, após 5 dias de cultivo (153 U/gss).

Nestas condições, a lipase apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a 50 °C, e manteve a atividade na faixa de pH de 3,0 a 8,0, e na temperatura de 45 °C, após 24 h de incubação (100%). A enzima produzida em cultivo submerso foi purificada em duas etapas, envolvendo diálise e cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de octil agarose, uma estratégia prática, rápida e relativamente barata, com rendimento final de 70% e fator de purificação 19,5. O perfil da enzima em SDS-PAGE mostrou a presença de uma banda de massa molecular de 69 kDa. Tentativas de determinação da massa molecular por filtração em gel indicou a formação de agregados de elevada massa molecular. A lipase produzida em cultivo submerso também foi imobilizada em octil Sepharose. As propriedades bioquímicas da lipase imobilizada foram comparadas com as da lipase livre purificada. As condições ótimas de atividade para ambas as formas da enzima foram pH 4,0 e temperatura de 45 °C. A lipase imobilizada apresentou aparente ativação na faixa de pH de 2,0 a 7,0 e maior estabilidade térmica, sendo observada atividade residual de 70% após 150 min. de incubação a 45 °C e $T_{1/2}$ de 175 min. a 50 °C. Ambas as formas foram ativadas por sulfato de manganês a 2 mM, DTT e β -mercaptoetanol a 10 mM. A lipase livre mostrou-se estável na maioria dos solventes orgânicos testados (10%, 1h a 10 °C), enquanto que a lipase imobilizada apresentou atividade superior a 100% nos solventes glicerol, dimetilsulfóxido, propilenoglicol, acetonitrila, 2-propanol, 1-propanol, xilol, n-hexano e iso-octano, não sendo observada correlação entre a estabilidade da enzima com a hidrofobicidade dos solventes. O perfil de hidrólise de *p*-nitrofenil ésteres indicou a preferência da lipase pelos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, sendo a maior atividade observada com *p*-nitrofenil palmitato. Os parâmetros cinéticos das lipases livres e imobilizada foram: K_m 0,016 e 0,08 mM e V_{max} 889,6 e 900,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ prot., respectivamente, indicando que a imobilização favoreceu a catálise. A produção de lipase em substratos agroindustriais e com gordura de frango foi considerada uma alternativa viável e barata sendo que a produção desta enzima com propriedades distintas daquela produzida por fermentação submersa pode favorecer sua aplicação no tratamento deste tipo de resíduo. Além disso, a purificação e imobilização da lipase conferiram a esta enzima importantes condições operacionais garantindo amplas possibilidades de aplicações industriais.

Palavras-chave: lipase, triacilglicerol acil hidrolase, *Candida viswanathii*, produção de enzimas, purificação de enzima, imobilização de enzima, caracterização de enzima.

ABSTRACT

Lipases are widely distributed enzymes in animals, plants, bacteria, yeasts and fungi, which hydrolyses ester bonds of triacylglycerols and fatty acids. In addition, these enzymes also catalyse other reactions as esterification, transesterification, aminolysis and lactonization, depending their water activity. The ability of lipases to perform very specific chemical transformation and their enantioselective properties has made them increasingly popular in many biotechnological applications. In this work, *Candida viswanathii* was selected among ninety filamentous fungi and yeast strains, due to as its lipase activity and culture conditions were studied aiming to increase the enzyme production. Furthermore, this study aimed to purify, immobilize and characterize the lipase produced in submerged cultures. The results showed that triolein and oleic acid are the best inducers of lipase activity. However, the highest lipase production was obtained from 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract in rotary shaker experiments at 27.5 °C, pH 6.0 and 210 rpm, after 72 h (19.0 g/L biomass; 100 U lipase activity). The addition of 0.1% (w/v) soy lecithin increased 1.5-fold the lipase production (147.5 U). Biochemical characterization of the crude enzyme revealed an acid lipase with optimum pH of 3.5, a property first described in *Candida* genus. Optimum temperature activity was 40 °C. Crude lipase was highly stable at pH 4.0 to 5.0 and at temperature 40 °C during 24 h (100%). Solid substrates cultures from industrial byproducts,

the highest lipase production was obtained in wheat bran and barley spent grain (1:1), 40% (w/w) chicken fat, 3.5% (w/w) yeast extract, humidity 40% after 5 days, at 30°C (153 U/gds). Under these culture conditions, the lipase showed optimum activity at pH 5.0 and 50 °C, and thermal enzyme stability at pH range 3.0-8.0 at 45 °C during 24 h (100%). The enzyme produced from submerged cultures was purified in two-steps involving dialysis and hydrophobic interaction chromatography on an octyl agarose column, a practical, fast and relatively inexpensive strategy, with a yield of 70% and a purification factor of 19.5. The SDS-PAGE enzyme profile showed a molecular mass of 69 kDa. Attempts to determine the molecular weight by gel filtration exhibit aggregates of high molecular weight. The lipase produced was also immobilized on octyl Sepharose. Biochemical properties of the immobilized lipase were compared to purified free enzyme and optimal activity for both were achieved at pH 4.0 and 45 °C. The immobilized lipase showed apparent activation at pH 2.0 to 7.0 and higher thermal stability, which was observed a residual activity of 70% after 150 min. at 45 °C and $T_{1/2}$ of 175 min. at 50 °C. The free and immobilized lipases were activated at manganese sulfate 2 mM and β -mercaptoethanol 10 mM. Free lipase was stable in most organic solvent tested (10%, 1h at 10 °C), while the immobilized lipase showed higher activity in the solvents glycerol, dimethylsulfoxide, propylene glycol, acetonitrile, isopropyl and n-propyl alcohol, xylol, hexane and isooctane, with no correlation between the enzyme stability and solvent hydrophobicity. The lipase hydrolysis profile on *p*-nitrophenyl esters displays its preference for long chain fatty acids, with greatest activity on *p*-nitrophenyl palmitate. Kinetic constants for the free and immobilized lipase were: K_m 0.16 and 0.08 mM and V_{max} 889.6 and 900.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$, respectively. Lipase production on agro industrial substrates and poultry fat was considered to be a viable and inexpensive, which its production may favor their application in treating of this waste. Furthermore, the purification and immobilization of the lipase gave to this enzyme important operational condition ensuring wide possibilities of industrial applications.

Keywords: lipase, *Candida viswanathii*, enzymes production, purification, immobilization, enzyme characterization

1. INTRODUÇÃO

As enzimas catalisam reações químicas com grande especificidade e alta velocidade. Essas reações são a base do metabolismo de todos os organismos vivos e fornecem enormes oportunidades para as indústrias realizarem conversões biocatalíticas com elegância, eficiência e economia (VAN BEILEN e LI, 2002). A tecnologia de enzimas é um campo interdisciplinar reconhecido como componente importante para o desenvolvimento industrial sustentável (OECD, 2001).

De acordo com a Global Industry Analysts (2012), o mercado de enzimas industriais entre os países desenvolvidos teve um crescimento moderado entre os anos de 2008 e 2009 devido à crise econômica mundial. A demanda de enzimas industriais para os próximos anos, entretanto, deverá crescer gradualmente, atingindo a marca dos US\$ 3,74 bilhões até o ano de 2015. Esse crescimento se deve ao aumento da demanda dessas enzimas, como as proteases e carboidrases, entre os países emergentes. Essas são responsáveis pelos maiores segmentos de produtos no mercado mundial de enzimas industriais. As lipases representam outro segmento de produto importante no mercado mundial com elevado potencial de crescimento devido às suas aplicações no setor de alimentos humano e animal, detergentes e biocombustíveis.

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas ubíquas de considerável significância fisiológica e potencial industrial. Essas enzimas, em condições naturais, catalisam a hidrólise de triacilgliceróis à glicerol e ácidos graxos livres. Em concentrações reduzidas de água, as lipases catalisam reações de síntese de triacilgliceróis e outras como transesterificação, aminólise e lactonização, importantes para obtenção de

produtos de alto valor agregado nos setores da indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e química fina (REETZ, 2002; HOUDE et al., 2004; FICKERS et al., 2011).

As lipases microbianas apresentam maior interesse em aplicações industriais por serem mais estáveis, não requererem cofatores, apresentarem ampla especificidade à substratos e alta enantioselectividade (CONTESINI et al., 2010; GRIEBELER et al., 2011). Muitos micro-organismos são conhecidos como produtores de lipases extracelulares, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (TREICHEL et al., 2010). A produção de lipase por fungos filamentosos é frequentemente realizada em substratos sólidos de origem agroindustrial (SINGHANIA et al., 2009; SANTIS-NAVARRO et al., 2011); enquanto que a produção de lipase por bactérias e leveduras é realizada em cultivos submersos com substratos de várias origens (TREICHEL et al., 2010).

A busca por novas fontes de lipases é justificada pela variedade de aplicações atuais e futuras que requerem a capacidade de se manterem estáveis e ativas em condições drásticas, incluindo a presença de solventes, ampla variação de pH e temperaturas. Assim, a seleção de novas linhagens produtoras de lipases é um dos procedimentos chave para se isolar novas lipases. O presente trabalho relata a produção, purificação, imobilização e caracterização da lipase de uma linhagem isolada de uma lagoa de estação de tratamento de efluente de petróleo, da Refinaria do Planalto Paulista, REPLAN, Paulínia, SP.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de lipase de uma linhagem selecionada a partir de ambientes naturais ou industriais, bem como purificar, imobilizar e caracterizar bioquimicamente esta enzima para avaliação de sua adequação à futuras aplicações industriais.

Objetivos específicos:

- Selecionar micro-organismos isolados de ambientes naturais e industriais e caracterizá-los quanto à produção de lipase;
- Caracterizar fungos filamentosos isolados de solo de Mata Atlântica, Caatinga e de ambiente de Cerrado quanto à produção de lipase;
- Avaliar os efeitos de diferentes fatores nutricionais e ambientais sobre a produção de lipase pela linhagem selecionada em cultivos submersos e determinar as características bioquímicas da enzima bruta;
- Avaliar os fatores nutricionais e ambientais sobre a produção de lipase em cultivos em substratos sólidos;
- Purificar a lipase produzida nas condições estabelecidas em cultivo submerso e determinar suas principais propriedades bioquímicas;
- Imobilizar a lipase produzida nas condições estabelecidas em cultivo submerso e determinar suas principais propriedades bioquímicas, comparando-as com as da enzima livre.

Capítulo 1

REVISÃO DA LITERATURA

1. Lipases: definição e mecanismos de ação

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases – E.C. 3.1.1.3) constituem um grupo especial de enzimas cuja função biológica é catalisar a hidrólise de ligações ésteres de ácidos carboxílicos. A função natural das lipases em um meio aquoso é hidrolisar totalmente ou parcialmente triglicerídios fornecendo diglicerídios, monoglicerídios, ácidos graxos livres e glicerol (HOUDE et al., 2004; GUTIÉRREZ-AYESTA et al., 2007) (**Figura 1**).

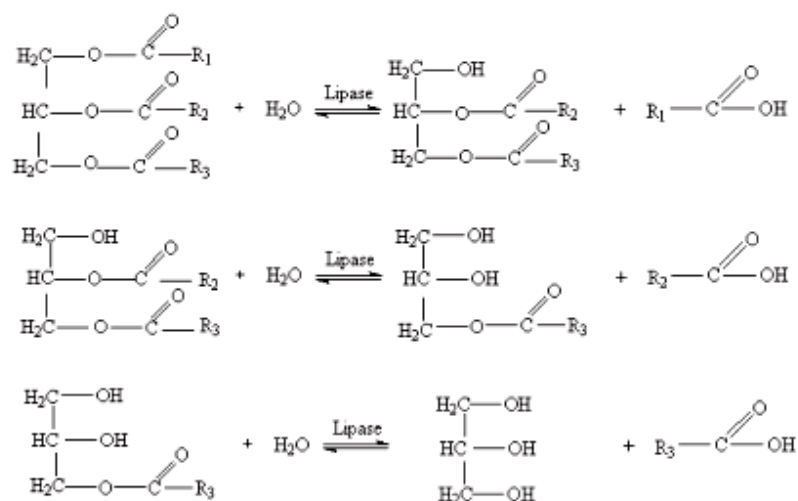


Figura 1. Hidrólise sequencial de um triacilglicerol típico por uma triacilglicerol acil hidrolases (CASTRO et al., 2004).

Em condições limitantes de água no meio reacional, as lipases são capazes de reverter as reações de hidrólise para o sentido de esterificação, e catalisar outras reações como transesterificação (interesterificação, alcoólise, e acidólise), aminólises (síntese de aminas) e lactonização (CARVALHO et al., 2003; PAQUES e MACEDO, 2006) (**Figura 2**).

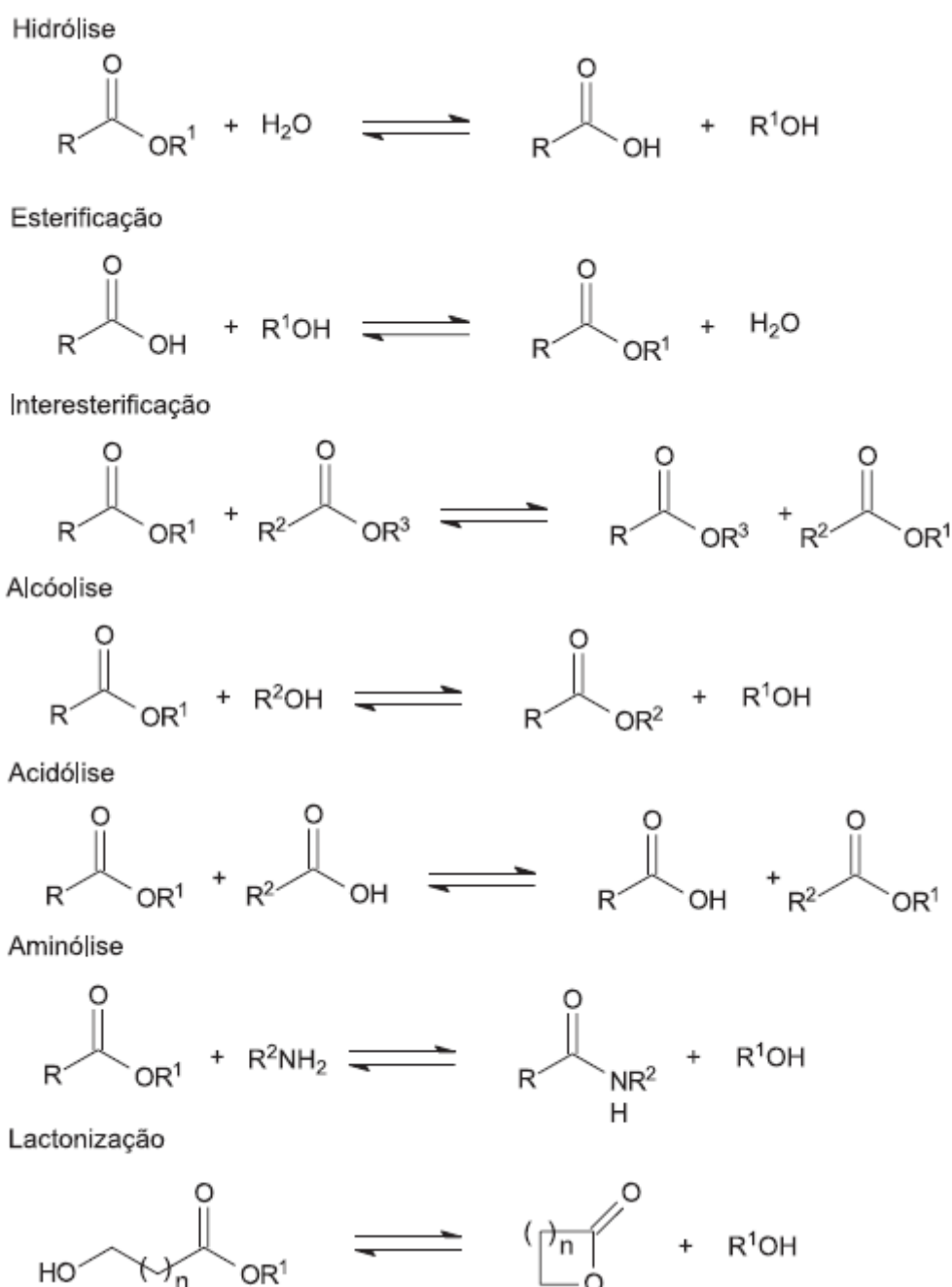


Figura 2. Reações catalisadas por triacilglicerol acil hidrolases (PAQUES e MACEDO, 2006).

As lipases são serino-hidrolases pertencentes à família estrutural das α/β -hidrolases cuja atividade depende principalmente da tríade catalítica geralmente formada por resíduos de serina, histidina e aspartato/glutamato (OLLIS et al., 1992; HOLMQUIST, 2000) (**Figura 3**). Essa tríade catalítica é também observada em serino proteases, e, portanto, a catálise por lipases ocorre de modo similar à das serino proteases. O resíduo de serina geralmente aparece inserido no pentapeptídeo conservado Gly–X–Ser–X–Gly (onde X representa um aminoácido ácido), formando uma dobra β - α característica, a dobra nucleofílica (JAEGER et al., 1999; FICKERS et al., 2011). A hidrólise do substrato é realizada através da formação de um intermediário tetraédrico, que é estabilizado por interações com os aminoácidos que constituem uma cavidade no sítio ativo, chamada cavidade do oxianion (JAEGER et al., 1999; FICKERS et al., 2011).

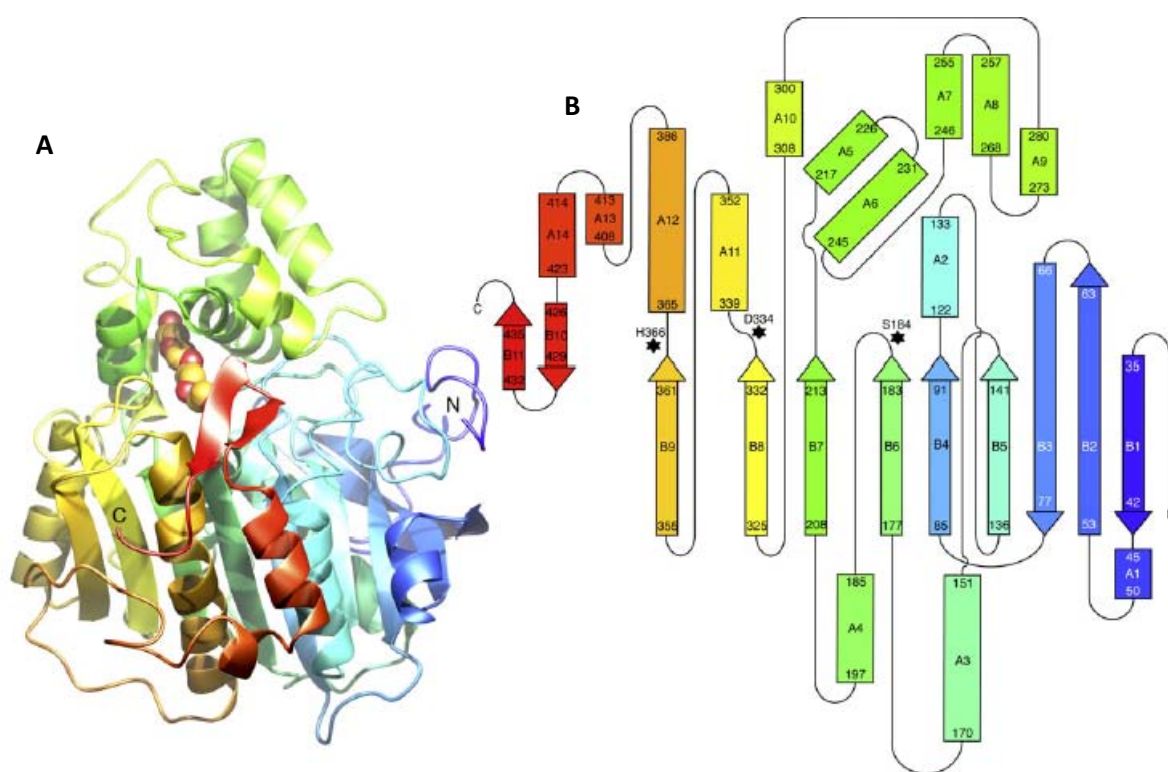


Figura 3. Estrutura completa de uma cadeia polipeptídica da lipase A de *Candida antarctica* (CaLA), pertencente à família α/β -hidrolase. α -Hélices estão indicadas por retângulos e folhas β estão indicadas por setas, começando com azul na extremidade N-terminal (N) e finalizando com vermelho na extremidade C-terminal (C). Os resíduos do sítio ativo Ser184, Asp334 e His366 são representados com estrelas pretas em **B**, e uma molécula de polietilenoglicol está representada por um modelo de preenchimento de espaço em **A** (ERICSSON et al., 2008)

O mecanismo de ação de lipases se inicia com um ataque do átomo de oxigênio do grupo $-OH$ do resíduo de Ser nucleofílico ao carbono carbonílico ativado do éster lipídico, ligado ao sítio ativo da enzima (**Figura 4**).

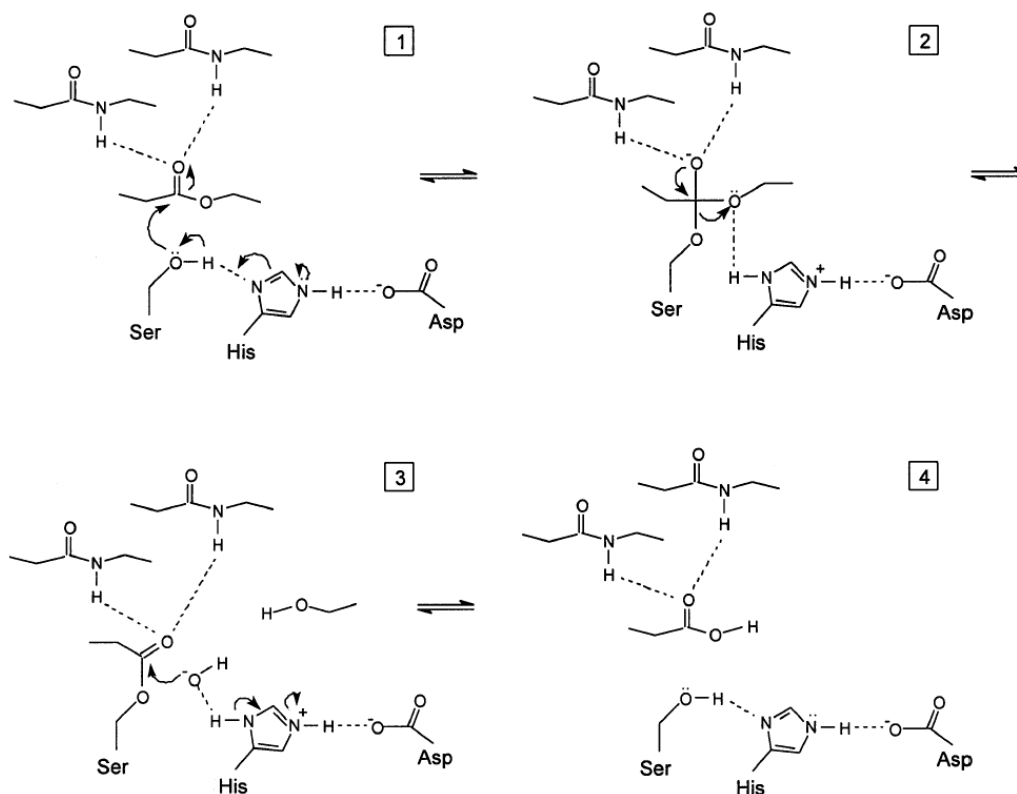


Figura 4. Mecanismo de reação de lipases (JAEGER et al., 1999). (1) Ligação do lipídeo, ativação do resíduo de serina pela histidina vizinha e ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico do substrato pelo O^- da Ser. (2) Intermediário tetraédrico transitório, com O^- estabilizado por ligações de hidrogênio com dois grupos $-NH$ peptídicos. A histidina doa um próton para o componente álcool que sai do substrato. (3) O intermediário covalente (acil enzima), no qual o componente ácido do substrato é esterificado ao resíduo serina da enzima. A entrada da molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina vizinho, e a hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do intermediário covalente. (4) O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o componente acil é quebrada, e o produto acil é liberado como ácido carboxílico.

Um intermediário tetraédrico transitório se forma, o qual é caracterizado pela carga negativa do oxigênio carbonílico da ligação éster a ser clivada e pelos quatro átomos ligados ao C carbonílico dispostos de forma tetraédrica. O intermediário é estabilizado pelas ligações hidrogênio entre o átomo de oxigênio carbonílico negativamente carregado (oxiânion) e entre pelo menos dois grupos -NH peptídicos da cavidade do oxiânion. A nucleofilicidade da Ser que ataca é aumentada pela His do sítio catalítico, para a qual é transferido um próton do grupo -OH da Ser. A transferência desse próton é facilitada pela presença do ácido catalítico, o qual orienta precisamente o anel imidazol da His e, parcialmente, neutraliza a sua carga. Subsequentemente, o próton é doado ao oxigênio da ligação éster, que é então clivada. Neste estágio, o componente ácido do substrato é esterificado à Ser nucleofílica (intermediário covalente), enquanto que o componente álcool se difunde no meio. Em seguida, ocorre a etapa de desacilação, na qual uma molécula de água hidrolisa o intermediário covalente. A His do sítio ativo ataca essa molécula de água pela ligação a um de seus prótons. O íon OH^- resultante ataca o C carbonílico do grupo acil covalentemente ligado à Ser. Novamente se forma um intermediário tetraédrico transitório negativamente carregado, o qual é estabilizado por interações com a cavidade oxiânion. A His doa um próton ao oxigênio da Ser ativa, liberando o componente acil como ácido carboxílico, e a enzima que pode iniciar a catálise de outra molécula de substrato (JAEGER et al., 1999).

Além das lipases, outras enzimas, como as esterases (E.C. 3.1.1.1) e cutinases (3.1.1.74) apresentam atividade catalítica sobre ligações ésteres de triacilgliceróis (JAEGER et al., 1999; CHAHINIAN et al., 2002; PIO et al. 2008). Para melhor definir e classificar uma lipase verdadeira foram estabelecidos dois critérios. Primeiro, a enzima deve ser ativada em uma interface lipídeo-água, devendo a atividade aumentar significativamente quando o substrato (triacilglicerol) formar uma emulsão. Segundo, a enzima deve conter uma ou duas tampas (*lid* ou *flap*) que cobre o sítio ativo da enzima, movendo-a quando em contato com uma interface (CAJAL et al., 2000; CHERUKUVADA et al., 2005; JAMES et al., 2007; WANG et al., 2010). Assim, as lipases verdadeiras são capazes de identificar um substrato insolúvel ou agregado, sendo sua atividade diretamente relacionada com a área total do substrato e não com a concentração do substrato (**Figura 5**); enquanto que as esterases preferencialmente hidrolisam ligações ésteres de ácidos graxos de cadeia curta solúveis em água (FOJAN et al., 2000). As cutinases são enzimas que também podem apresentar uma tampa e pertencentes à família das serino hidrolases capazes de hidrolisar ligações ésteres de um biopoliéster conhecido como cutina (presente na cutícula de folhas de plantas), liberando seus monômeros.

Este poliéster é composto de glicerol e dos seguintes ácidos graxos: ω -hidróxiácidos, ácido dihidroxidróxipalmítico, ácidos 18-hidróxi-9,10-epóxi 18:0 e 18:1 (Δ^{12}), ácidos 9,10,18-triidróxi (18:0) e 18:1 (Δ^{12}) (PIO et al., 2008).

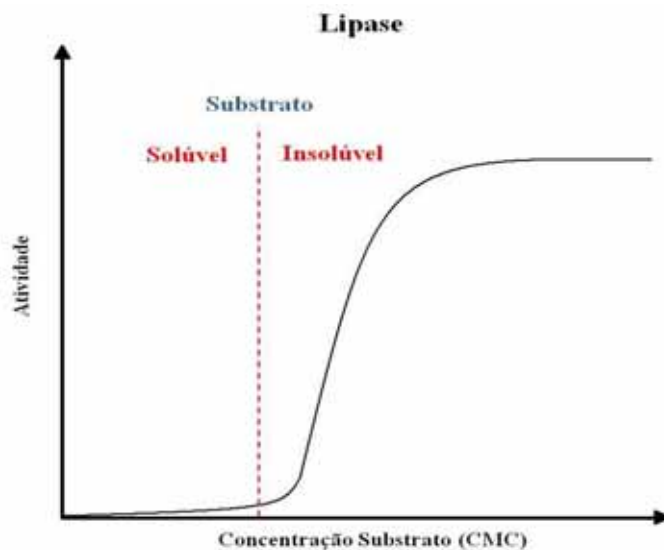


Figura 5. Atividade catalítica de lipase em função da concentração de substrato (modificado de SARDA e DESNUELE, 1958). A atividade lipase é quase nula quando o substrato está solúvel em baixa concentração, ocorrendo um aumento da atividade quando a concentração micelar crítica (CMC) é ultrapassada.

A presença da tampa que recobre o sítio ativo das lipases confere a este grupo de enzimas um mecanismo peculiar de ativação interfacial descrito originalmente por Sarda e Desnuelle (1958). Em meio aquoso elas existem em duas conformações: fechada e inativa, onde o sítio ativo está completamente isolado do meio reacional, e na conformação aberta e ativa, quando a tampa está deslocada e estabilizada por interações iônicas ou ligações de hidrogênio com uma parte da superfície da lipase, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo (SARDA e DESNUELLE, 1958; NOBLE et al., 1993; PALOMO et al., 2004). Cajal et al. (2000) estudaram o mecanismo de ativação interfacial de uma lipase de *Thermomyces lanuginosa* na presença de diferentes concentrações de triacilglicerol, mostrando que a enzima ligou-se a esta interface na conformação aberta (ativa), promovendo um deslocamento da tampa helicoidal para longe do sítio ativo. Esta conformação aberta foi estabilizada por uma

combinação de interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a face de ligação da enzima aos lipídeos e a interface. (**Figura 6**).

Cherukuvada et al. (2005) usando simulações dinâmicas moleculares demonstraram que a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* apresenta, além da primeira tampa, uma segunda que desencadeia o movimento da primeira (**Figura 7**). Esses autores relataram pela primeira vez o movimento de uma tampa dupla, bem como o jogo de interações hidrofóbicas na dinâmica desse processo.

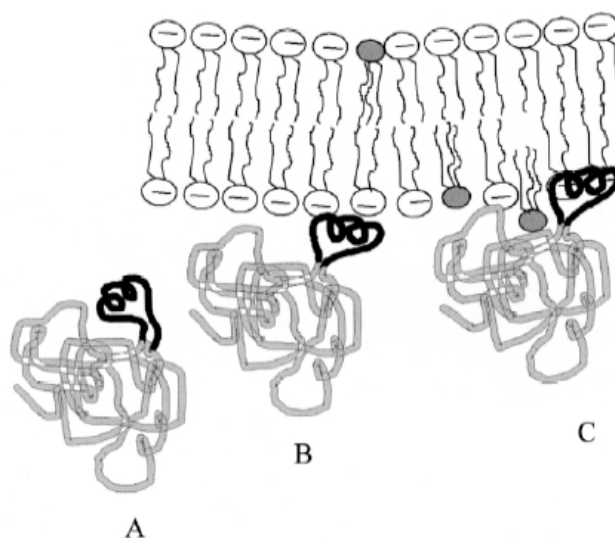


Figura 6. Modelo para a ligação interfacial e ativação da lipase de *Thermomyces lanuginosa*. (A) lipase em solução está na forma fechada (inativa), com a tampa (preto) cobrindo o sítio ativo; (B) ligação da lipase à pequenas vesículas unilamelares de lipídeos aniônicos, promovendo deslocamento da tampa e expondo uma grande cavidade hidrofóbica em torno do sítio ativo que interage com a interface lipídica, estabilizando a forma aberta (ativa); (C) o substrato particionado (mostrado em cinza) pode então acessar a tríade catalítica (CAJAL et al., 2000).

Muitos estudos foram desenvolvidos na tentativa de compreender os processos envolvidos na ativação interfacial dessas enzimas. O fenômeno de ativação interfacial poderia ser considerado como uma resposta evolucionária ao requerimento de hidrolisar substratos insolúveis. Essa propriedade distinguiria uma lipase verdadeira das esterases, que catalisam a hidrólise de ésteres solúveis, sendo o mecanismo de ativação interfacial uma propriedade

única das lipases (PETERS e BYWATER, 2001). Contudo, sabe-se que nem todas as lipases apresentam a estrutura de tampa recobrindo o sítio ativo, como as de *Candida cylindracea*, e outras que apresentam essa estrutura não são ativadas por uma interface, como é o caso das lipases de *Candida antarctica* (JAEGER e REETZ, 1998). Assim, a ausência da ativação de uma enzima na presença de uma interface lipídeo-água não é um requisito confiável para classificação como esterase ou lipase, sendo que a principal característica que diferencia uma lipase de uma esterase é a hidrólise de ésteres insolúveis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa (PAIVA et al., 2000).

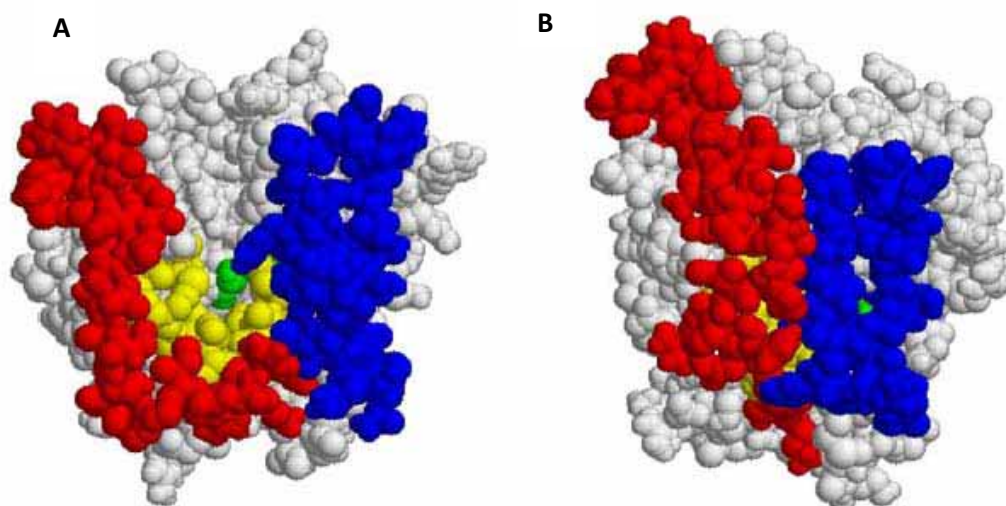


Figura 7. Simulação do movimento da tampa da lipase de *Pseudomonas aeruginosa*. **A)** conformação aberta mostrando resíduos da cavidade do sítio ativo em amarelo, e resíduos das tampas em vermelho (tampa 1) e azul (tampa 2). **B)** conformação fechada mostrando as tampas sobre o sítio ativo da enzima (CHERUKUVADA et al., 2005).

As lipases são classificadas com base na especificidade de hidrólise dos substratos triglicéridos. De acordo com Davranov e Khalameizer (1997) e Paques e Macedo (2006), conforme a ação dessas enzimas, elas podem ser classificadas como:

1) Regiosseletivas, que são subdivididas em:

- *Lipases não-específicas*: hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (**Figura 8**);

- *Lipases 1,3-específicas*: hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (**Figura 8**).

2) Tipo-seletivas com relação ao tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação do grupo acila.

3) Enantiosseletivas.

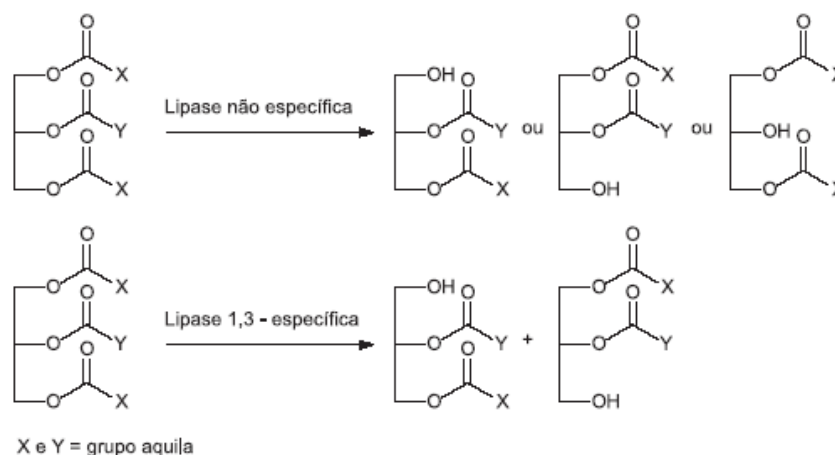


Figura 8. Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3-específica (PAQUES e MACEDO, 2006).

O fato das lipases serem capazes de distinguir alguns fatores estruturais das cadeias acila, como tamanho da cadeia, número, posição ou configuração das duplas ligações (ANTCZAK et al., 2009), permite que algumas lipases sejam altamente específicas. Por exemplo, a lipase produzida por *Geotrichium candidum* hidrolisa preferencialmente ácidos graxos com insaturação na posição Δ^6 (DAVRANOV e KHALAMEIZER, 1997). Contudo, lipases que hidrolisam ácidos graxos na posição 2 do triglicerídeo são raramente encontradas na natureza (CONTESINI et al., 2010).

2. Métodos para seleção de novas fontes de lipase

A demanda industrial e a percepção da variedade de futuras aplicações de lipases justificam o interesse por fontes microbianas de lipase com capacidade de se manterem estáveis e ativas em condições extremas (ROMDHANE et al., 2010). Os métodos utilizados para seleção de micro-organismos são dependentes de vários fatores que incluem o crescimento microbiano, a produção e liberação da enzima, a atividade e especificidade do substrato e a sensibilidade de detecção da atividade lipolítica (SHELLEY et al., 1987; BEISSON et al., 2000). Esses métodos são divididos em duas categorias: aqueles no qual um corante indicador é usado como mecanismo de detecção de lipólise ou por meio de mudanças na aparência do substrato (métodos indiretos ou qualitativos), e aqueles que envolvem a hidrólise de um substrato lipídico sintético ou natural (métodos diretos ou quantitativos).

Nos *métodos indiretos ou qualitativos*, a lipólise é observada diretamente através da mudança da aparência do substrato em placa contendo ágar, com a formação de um halo de degradação do substrato emulsificado (trioleína ou tributirina) em torno da colônia, em vários meios de crescimento (ERTUGRUL et al., 2007). O halo formado pode ser de precipitação de sais em meios de cultivo contendo Tween 20 ou Tween 80 (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; SAMAD et al., 1989; KO et al., 2005). Os corantes indicadores victoria blue, spirit blue, azul do Nilo e rodamina B também são utilizados com esse propósito, sendo o resultado observado através da mudança de coloração dos indicadores, causada pela alteração do pH do meio de cultivo devido à liberação dos ácidos graxos (SHELLEY et al., 1987, SAMAD et al., 1989; MESSIAS et al., 2009; HASAN et al., 2009; SRIMHAN et al., 2010).

Essas técnicas são muito convenientes para uma seleção rápida de micro-organismos lipolíticos, contudo, podem resultar alguns falso-positivos, porque a acidificação do meio pode ocorrer devido à geração de outros metabólitos ácidos, que não os ácidos graxos livres liberados pelas lipases microbianas. Além disso, essa prática deve ser utilizada com cautela, uma vez que a difusão de uma proteína através do gel é uma função da concentração da proteína e o diâmetro das zonas de hidrólise produzidas pela difusão da enzima pode ser uma função de sua concentração e não da sua atividade (SHELLEY et al., 1987).

Os *métodos diretos ou quantitativos* podem utilizar um triglicerídeo como substrato para lipases que pode ser sintético (tributirina ou trioleína) ou natural (óleos vegetais ou animais). A atividade enzimática é determinada empregando-se a titulação dos ácidos graxos

Além dos métodos anteriormente descritos, outros métodos quantitativos podem ser utilizados para análise da atividade lipase, tais como fluorescência (WILTON, 1990; WILTON, 1991), cromatográficos (GUPTA et al., 2003; HASAN et al., 2009) e imunológicos (CHRISTENSSON et al., 1985; HASAN et al., 2009).

A escolha do método a ser utilizado na determinação da atividade enzimática deve ser criteriosamente analisada para atender os objetivos do trabalho, uma vez que esses métodos podem fornecer informações adicionais como ativação interfacial e especificidade da enzima (GUPTA et al., 2003; HASAN et al., 2009).

3. Produção de lipases microbianas

Na literatura, comumente encontram-se relatos de micro-organismos que produzem múltiplas formas de lipase em um meio de cultura, com diferentes propriedades físico-químicas (SHARMA et al., 2001; VAKHLU e KOUR, 2006; CAI et al., 2009).

3.1. *Fermentação submersa*

Independente de suas vantagens e desvantagens, aproximadamente 90% de todos os biocatalisadores industriais são produzidos por algum tipo de processo de fermentação submersa em meios de cultivo otimizados e micro-organismos geneticamente modificados (HÖLKER et al., 2004; CONTESINI et al., 2010). O escalonamento do processo de produção de lipase requer a escolha de micro-organismo e substratos para a produção, manipulação das variáveis que afetam a produção em escala de laboratório, a escolha da configuração do biorreator e o desenvolvimento e validação de modelos matemáticos como ferramenta para escalonamento, controle do processo e otimização (TREICHEL et al., 2010). A produção de lipase é fortemente influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH de cultivo, temperatura e aeração/agitação (ELIBOL e OZER, 2001; SHARMA et al., 2001). A influência de fontes de carbono e nitrogênio individuais, bem como estudos fisiológicos da secreção, indução ou repressão de lipases são facilmente conduzidas em escala de laboratório com métodos paramétricos (DALMAU et al., 2000; LOTTI et al., 2001; LIMA et al., 2003; MONTESINOS et al., 2003; BAPIRAJU et al., 2005; GULATI et al., 2005; LIN et al., 2006b; MESSIAS et al., 2009; KIM et al., 2010; COLIN et al., 2010).

Os modelos matemáticos empregados na otimização da produção de lipases são muito úteis para suprir as desvantagens da otimização passo a passo que não inclui os efeitos de interações entre a composição do meio de cultivo e fatores ambientais sobre a atividade da enzima (KUMAR e GUPTA, 2008; TENG e XU, 2008; AÇIKEL et al., 2010). O modelo Plackett-Burmen utiliza dois níveis e requer poucos experimentos, comparado ao modelo fracionado. Esse modelo foi utilizado para identificar e selecionar as variáveis mais importantes para a produção de lipase e, posteriormente, otimizados em modelos de superfície de resposta (HE e TAN, 2006; GUPTA et al., 2007; KUMAR e GUPTA, 2008). Rajendran et al. (2008) relataram que o modelo Luedeking-Piret e suas modificações foram considerados eficientes para prever a massa celular, produção de lipase e consumo de glicose, respectivamente, com alto coeficiente de correlação. A utilização de modelo fatorial composto central (CCD) (CHENNUPATI et al., 2009), modelo fatorial de composto central completo (CCCD) (ELIBOL e OZER, 2002; WOLSKI et al., 2008), modelo fatorial Box-Behnken (AÇIKEL et al., 2010), entre outros, possibilitaram a otimização das condições de cultivo e análise das interações entre os parâmetros utilizados com um número reduzido de experimentos.

Os processos fermentativos em escala piloto permitem a avaliação de outros fatores envolvidos durante a produção de lipases dada as características do processo (TREICHEL et al., 2010). Kar et al. (2008) investigou a influência de fatores extracelulares em sistema de batelada utilizando reatores tipo STR (*stirred tank reactor*) em diferentes escalas. Esse sistema permitiu reproduzir o fenômeno hidrodinâmico encontrado em larga escala quanto aos três fatores analisados: o crescimento celular, a produção de lipase extracelular e a indução do gene LIP2, que codifica a principal lipase de *Yarrowia lipolytica*. O processo de fermentação em batelada alimentada foi utilizado para minimizar os efeitos do metabolismo celular e, principalmente, para evitar a inibição pelos produtos da reação (KIM e HOU, 2006; SURRIBAS et al., 2007; ZHAO et al., 2008; ARNAU et al., 2010).

3. 2. Fermentação em substrato sólido

A fermentação em substrato sólido tornou-se uma atraente alternativa à fermentação submersa para aplicações específicas devido aos avanços no controle do processo, com o uso de novos modelos de reatores e de novos substratos para essas fermentações e baixo custo do

substrato (BELLON-MAUREL et al., 2003; COUTO e SANROMÁN, 2006; SUN et al., 2009; RIGO et al., 2010; SANTIS-NAVARRO et al., 2011). A fermentação em substrato sólido é definida como um processo no qual o substrato insolúvel é utilizado como suporte ou como fonte de carbono e energia na ausência de água livre (PANDEY et al., 2000; COUTO e SANROMÁN et al., 2006). Esse tipo de fermentação reproduz as condições dos processos microbiológicos naturais como a compostagem e ensilagem (COUTO e SANROMÁN et al., 2006).

A produção de lipases microbianas por meio de fermentação em estado sólido por fungos utilizando substratos como farelo de trigo (GARLAPATI e BANERJEE, 2010) e em resíduos agroindustriais de baixo custo como bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUEZ et al., 2006), torta da extração do óleo de oliva (CORDOVA et al., 1998; MOFTAH et al., 2012), torta de coco de babaçu (GOMBERT et al., 1999; CAVALCANTI et al., 2005), torta de gergelim (KAMINI et al., 1998), torta de mamona (MAHANTA et al., 2008), torta de soja (DI LUCCIO et al., 2004), torta de amendoim (JOSEPH et al., 2011). Esses substratos contêm nutrientes residuais que podem servir tanto como fontes de carbono como de nitrogênio (SALIHU et al., 2012), e foram relatados como bons substratos para a produção de enzimas microbianas (RAMACHANDRAN et al., 2007). Além disso, os processos utilizando substratos sólidos são economicamente importantes para países, como o Brasil, que possuem abundante biomassa e resíduos agro-industriais podendo ser utilizados como material de baixo custo (DAMASO et al., 2008). A maioria dos estudos, portanto, foi realizada utilizando-se poucas gramas de substrato, temperaturas mesofílicas e culturas puras bem conhecidas (SUN e XU, 2008; GUTARRA et al., 2009; GARLAPATI e BANERJEE, 2010; RIGO et al., 2010; IFTIKHAR et al., 2011). Poucos estudos foram conduzidos em escalas piloto ou industrial (MALA et al., 2007; EDWINOLIVER et al., 2010).

Os biorreatores utilizados para o escalonamento de processos desenvolvidos para fermentação em substrato sólido são divididos em quatro tipos baseados no sistema de aeração e agitação empregado: bandeja, leito fixo, tambor horizontal e leito fluidizado (COUTO e SANROMÁN, 2006; SINGHANIA et al., 2009). A produção de lipase, porém, está limitada aos fermentadores de bandeja e leito fixo; não sendo encontrados na literatura estudos que envolvem a produção de lipase em reatores de tambor horizontal ou leito fluidizado (TREICHEL et al., 2010). Para a produção de lipase por *Aspergillus niger*, Edwinoliver et al. (2010) determinaram como melhor substrato uma mistura contendo farelo de trigo, torta da extração do óleo de coco e trigo em grão. Esse substrato foi transferido para

escalas piloto de 100 g e 3 kg em bandejas de fermentação. Os rendimentos da produção nessas condições foram de 96 e 83%, respectivamente, sendo o decréscimo da produção após 72 h de cultivo atribuído ao aumento da temperatura de 30 °C para 38 °C, na bandeja contendo 3 kg de substrato. Cavalcanti et al. (2005) estudaram a produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* em reatores de leito fixo, em escala de bancada, contendo torta de babaçu e bagaço de cana-de-açúcar. A produção de lipase foi de 26,4 U/g de substrato a temperatura de 27 °C e fluxo de ar de 0.8 L/min., utilizando-se modelo estatístico empírico.

3. 3. Fatores nutricionais

As lipases microbianas são enzimas exclusivamente extracelulares e a produção é fortemente influenciada pelas condições nutricionais e fatores físico-químicos, tais como pH, temperatura e agitação (SARKAR et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2006; COLIN et al., 2010). O fator mais importante para a expressão dessas enzimas é a fonte de carbono, uma vez que a maioria das lipases são indutíveis (GUPTA et al., 2004; TREICHEL et al., 2010). Nesse caso, as fontes de carbono atuam tanto como fonte de energia como também indutor (FICKERS et al., 2004). Essas são de origem vegetal ou animal, constituída de triacilgliceróis, ácidos graxos e ésteres hidrolisáveis entre outras fontes menos convencionais (DOMÍNGUEZ et al., 2003; PAPANIKOLAOU et al., 2007).

A escolha de óleos vegetais para a produção de lipase depende de alguns fatores importantes como a alta porcentagem de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, disponibilidade e custo (LAKSHMI et al., 1999). Muitos pesquisadores utilizaram o azeite de oliva, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de palma, óleo de milho para produção de lipases por vários micro-organismos (CIHANGIR e SARIKAYA, 2004; TAN et al., 2004; TENG et al., 2009). Esses óleos apresentam o ácido oleico como um dos principais componentes dos triacilgliceróis (OBRADORS et al., 1993; SHARMA et al., 2001).

As fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas também apresentam importante função na síntese de enzimas, sendo utilizadas pelas células para síntese de muitos fatores de crescimento celular e aminoácidos necessários para o metabolismo celular e síntese de enzimas (TAN et al. 2004). Freire et al. (1997) relataram que a linhagem de *Penicillium restrictum* foi incapaz de crescer em fontes de nitrogênio inorgânicas. Esta linhagem, contudo, apresentou alta taxa de crescimento e produção de lipase em fontes de nitrogênio orgânica

(peptona de carne, peptona de soja e caseína). O alto rendimento na produção de lipase no meio de cultivo com peptona de carne foi atribuído ao conteúdo em aminoácidos e/ou cofatores requeridos pela fisiologia do micro-organismo compatível à síntese de lipase.

4. Purificação de lipases microbianas

Muitas aplicações industriais de lipases não requerem preparações homogêneas da enzima, uma vez que, certo grau de pureza é suficiente para o seu uso (SAXENA et al., 2003b). A purificação da enzima, entretanto, é indispensável para caracterização da enzima quanto às suas propriedades físico-químicas, bem como para analisar sua estrutura primária de aminoácidos e estrutura tridimensional (SAXENA et al., 2003b; GUPTA et al., 2004; LI e ZONG, 2010). Os estudos de raios-X de lipases puras possibilitam esclarecer a relação estrutura-função e contribuem para melhor entendimento dos mecanismos cinéticos da ação hidrolítica, de síntese e mudança de grupos de ésteres (TAIPA et al., 1992; SAXENA et al., 2003b). Além disso, preparações de lipases purificadas são requeridas em processos industriais que empregam enzimas para a produção biocatalítica de produtos químicos, farmacêuticos e cosméticos (FENG et al., 2004; KOBAYASHI, 2010; SHARMA et al., 2011).

Uma variedade de métodos foi usada para a purificação de lipases de diferentes fontes microbianas, sendo que as estratégias mais utilizadas incluem técnicas não-específicas como precipitação com sulfato de amônia, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de troca iônica. Em alguns casos, cromatografia de afinidade também tem sido utilizada (SHARMA et al., 2001). A **Tabela 1** resume as técnicas utilizadas e os principais resultados obtidos na purificação de lipases microbianas várias fontes.

Um método que utiliza a separação de fases, um fenômeno que ocorre quando duas soluções de polímeros solúveis em água são misturadas, foi usado para purificação de lipase. Neste procedimento, um polímero e uma solução de sal também podem ser usados para formar um sistema de duas fases em meio aquoso. Os polímeros mais comumente empregados são polietileno glicol e dextrana (SAXENA et al., 2003b). Gupta et al. (2005) utilizou uma matriz de polipropileno para desenvolver um procedimento simples de purificação da lipase produzida por *Burkholderia multivorans*. Após a matriz ter sido tratada

com metanol, uma amostra de lipase foi adicionada, agitada por 2 horas e ligada à matriz. Entre outros detergentes testados, somente Triton X-100 foi capaz de eluir a enzima do suporte. Esse procedimento permitiu uma purificação de 3,0 vezes e um rendimento de 66% foi obtido após precipitação com 50% (v/v) acetona.

Bastida et al. (1998), Palomo et al. (2004) e Volpato et al. (2010) utilizaram a capacidade de ativação interfacial das lipases como ferramenta para purificar diferentes lipases microbianas. Esse procedimento usou a imobilização de uma lipase em um suporte altamente hidrofóbico com o sítio ativo exposto para o meio aquoso, que permitiu a adsorção de outras lipases via um mecanismo semelhante à formação de agregados bimoleculares (**Figura 10**).

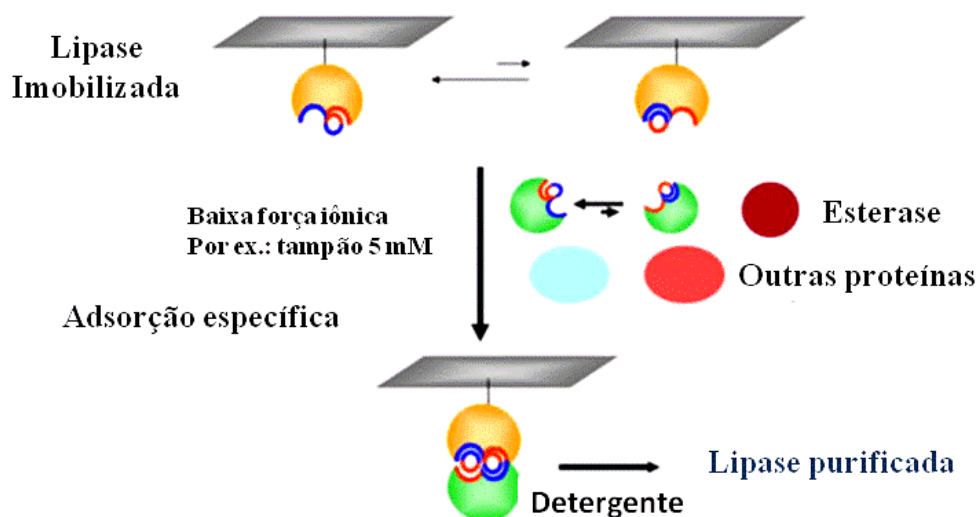


Figura 10. Representação da adsorção específica de lipases sobre uma matriz contendo lipase imobilizada (Adaptado de VOLPATO et al., 2010).

Tabela 1. Purificação de lipases microbianas.

Micro-organismos	Técnicas de purificação utilizadas	Fator purificação	Rendimento (%)	Referência
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	Ultrafiltração, cromatografia de troca catiônica	1,5	53,0	Trodler et al. (2008)
<i>Candida cylindracea</i> Lipase A	Precipitação com etanol, cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel	2,0	15,0	Rúa et al. (1993)
Lipase B		3,5	49,0	
<i>Candida rugosa</i> Lip 2	Cromatografia de interação hidrofóbica butil-Sepharose, cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel	2,5	9,5	Sánchez et al. (1999)
Lip 3		2,4	7,6	
<i>Geotrichum</i> sp. SYBC WU- 3 A	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , DEAE-celulose-32, cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100	ND	11,2	Cai et al. (2009)
3 B		ND	9,2	
<i>Yarrowia lipolytica</i> Lip2	Precipitação com acetona, cromatografia de troca iônica Q-Sepharose, cromatografia de interação hidrofóbica butil-Sepharose	26,5	23,0	Yu et al. (2007)
<i>Y. lipolytica</i> NCIM 3639	Ultrafiltração, cromatografia de troca iônica Q Sepharose, cromatografia de interação hidrofóbica Sepharose CL-4B	13,9	11,1	Sathish Yadav (2011)
<i>Rhizopus</i> sp.	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de troca iônica Q-Sepharose, Sephacryl	9,7	0,25	Koblitz e Pastore (2006)
<i>Rhizopus homothallicus</i>	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de interação hidrofobia butil-Sepharose, Cromatografia de exclusão molecular Superdex G-200	42,0	40,0	Mateoz Díaz et al. (2006)
<i>Mucor</i> sp.	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de troca iônica CM-Sephadex, cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75	10,6	21,0	Abbas et al. (2002)
<i>Malbranchea pulchella</i>	Filtração em membrana, cromatografia em Sephacryl S-200 e cromatografia em octil Sepharose	0,9	4,5	Pereira (2011)

Tabela 1. Continuação

Micro-organismos	Técnicas de purificação utilizadas	Fator purificação	Rendimento (%)	Referências
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de interação hidrofóbica fênil-Sepharose CL 4B, cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-100	149,6	54,1	Mhetras et al. (2009)
<i>Nomurae rileyae</i> Mj	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-100	23,9	1,65	Supakdamrongkul et al. (2010)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LX1	Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose FF	4,3	41,1	Ji et al. (2010)
<i>Pseudomonas gessardii</i>	Cromatografia de troca iônica DEAE-celulose, cromatografia de exclusão molecular G-25	7,6	16,2	Ramani et al. (2010)
<i>Burkholderia multivorans</i>	Matriz de Polietileno glicol, eluição com Triton X-100, precipitação com acetona	3,01	66,0	Gupta et al. (2005)
<i>Burkholderia multivorans</i> V2	Precipitação acetona, cromatografia de exclusão molecular.	24,5	0,96	Dandavate et al. (2009)
<i>Penicillium</i> sp. DS-39	Tratamento térmico, cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose, Precipitação com (NH ₄) ₂ SO ₄ , Sephacryl 100 HR-I, cromatografia de troca iônica Q-Sepharose e Sephacryl 100 HR-II	129,7	8,8	Dheeman et al. (2011)
<i>Staphylococcus warnerii</i> Lip A	Imobilização em suporte glioxil-DTT-lipase	13,0	46,0	Volpato et al. (2010)
Lip B		26,4	75,0	
Lip C		34,0	79,0	

Recentemente, novos materiais para purificação de lipases em escalas piloto foram desenvolvidos. Yao et al. (2011) ativaram a resina Sepharose 4B com grupos ciclohexamina ou ácido *m*-aminofenilbórico para desenvolver um sistema de purificação de lipase por afinidade. A lipase CALB expressa em *Pichia pastoris* foi aplicada em uma pequena coluna contendo partículas do gel com os ligantes acoplados e as proteínas foram eluídas com uma solução de ácido acético e etanol. A lipase purificada por esse procedimento apresentou um rendimento de 73%.

Procedimentos baseados em imuno-afinidade são mais seletivos para purificação de proteínas, alcançando altos níveis de purificação em um único passo (SAXENA et al., 2003a). Embora os custos desta técnica tenham sido reduzidos com a produção de anticorpos monoclonais em reatores, ela continua sendo uma das técnicas de afinidade mais caras (GUPTA et al., 2004). Esta técnica tem sido utilizada para estudos fisiológicos de indução e repressão da lipase em bactérias e leveduras (KOK et al., 1996; LOTTI et al., 1998; REIS et al., 2005). Lotti et al. (1998) utilizaram um procedimento de imuno-afinidade (Western Blots) para estudar o controle fisiológico da produção de lipase por *Candida rugosa* na presença de duas fontes de carbono (ácido oleico e glicose). Esta técnica possibilitou identificar uma lipase expressada constitutivamente na presença de glicose e outra induzida por ácidos graxos e inibida durante a transcrição pela adição de glicose ao meio de cultivo.

5. Imobilização de lipases microbianas

A imobilização de enzimas pode ser um meio eficaz de reutilizar a enzima e melhorar sua atividade e estabilidade. O tipo de suporte, bem como o método de imobilização influencia na atividade e estabilidade operacional de lipases imobilizadas. Assim sendo, a escolha apropriada do processo de imobilização pode reduzir significativamente os custos operacionais de processos industriais que envolvem lipases (HUNG et al., 2003). Além disso, esta estratégia é muitas vezes utilizada para superar problemas de armazenamento, estabilidade térmica e conformacionais, e ainda melhorar a qualidade dos produtos, evitando subprodutos indesejados ou intermediários e melhora a cinética em reações orgânicas (TAHIR et al., 2009).

Muitos métodos para a obtenção de lipases imobilizadas estão disponíveis, sendo que cada método apresenta um grau diferente de complexidade e eficiência. Os métodos mais

usados para a imobilização de lipases são: aprisionamento, encapsulação, ligação e auto-imobilização (MURTY et al., 2002; KNEZEVIC et al., 2004) (**Figura 11**).

O método de **aprisionamento** consiste em separar o biocatalisador do meio reacional por um envoltório semipermeável (SHELDON, 2007). Este tipo de imobilização protege a enzima do contato direto com o ambiente, minimizando o efeito do contato com bolhas de gases, ação mecânica e contato com solventes orgânicos, mas tem o inconveniente das limitações da transferência de massas e baixa carga enzimática (BRADY e JORDAAN, 2009). Um método comum de aprisionamento de lipases consiste no uso de matrizes de sílica sol-gel formadas por polimerização. Uma lipase de *C. rugosa* foi imobilizada em polímero de álcool polivinílico - ácido bórico para esterificação de ácido *n*-butírico a etil-butirato em solventes orgânicos (DAVE e MADAMWAR, 2006). A enzima manteve 100% de atividade após 8 ciclos de reuso e ótima estabilidade de armazenamento, pois após 10 meses, a 10 °C, não apresentou perda significativa na geração do produto analisado. Pirozzi et al. (2009) imobilizaram uma lipase de *Rhizopus oryzae* em uma matriz de sol-gel à base de zircônia em um único passo, de modo que, quando a gelificação ocorreu a enzima permaneceu aprisionada e uniformemente dispersa no gel. Neste procedimento, a atividade da enzima imobilizada aumentou em 3,8% em relação à enzima livre, ocorrendo perda de 30% da atividade a 50 °C, após 5 dias de incubação.

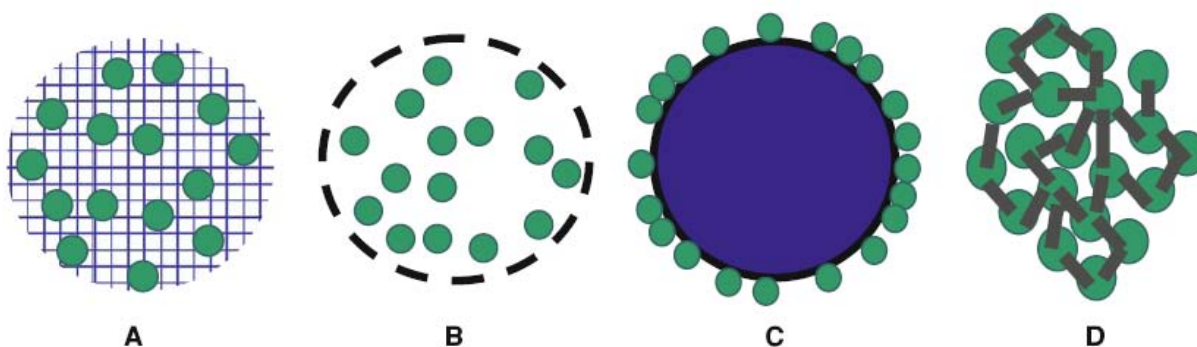


Figura 11. Estratégias de imobilização de enzimas: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) ligação, (D) auto-imobilização (Adaptado de Brady e Jordan, 2009).

O método de **encapsulação** é semelhante ao método de aprisionamento. Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa em que moléculas

grandes, tais como enzimas, não são capazes de difundir através desta membrana, enquanto que moléculas pequenas, como substratos e produtos, se difundem (DALLA-VECHIA et al., 2004). Diversos polímeros naturais, tais como alginato e *k*-carragena, gelificam em certas condições e servem para aprisionar biocatalisadores em geral. Neste procedimento, além da desvantagem difusional, deve-se garantir a inexistência de agentes quelantes, como fosfato e EDTA, nos meios de reação, pois na presença deles o gel vai se desarranjando e o biocatalisador acaba por se desprender e se solubilizar (FRASER e BICKERSTAFF, 1997). Yadav e Jadhav (2005) desenvolveram um procedimento de imobilização da lipase B de *C. antarctica*, no qual a enzima foi pré-imobilizada em sílica meso-porosa e encapsulada em alginato de cálcio, com rendimento de 26% e atividade recuperada 62%. Neste procedimento, a imobilização favoreceu o reuso da enzima sem perda de atividade após o quarto ciclo, e evitou um cisalhamento das pérolas de alginato de cálcio no interior de um reator agitado. Uma lipase de *C. rugosa* foi encapsulada em matriz quimicamente inerte sol-gel na presença de *calix(aza)crowns* como novo aditivo. A enzima encapsulada apresentou maior rendimento que a enzima livre na hidrólise enantioseletiva do composto éster metílico naproxeno, retendo 18% de sua atividade de reação enantioseletiva, após o sexto reuso (UYANIK et al., 2011).

Os métodos que envolvem a **ligação** da enzima em um suporte são divididos em dois grupos: ligação covalente e adsorção. A ligação covalente é baseada na formação de ligações entre um suporte e alguns grupos funcionais de resíduos de aminoácidos na superfície da enzima. Neste procedimento, o suporte é primeiro ativado por um reagente específico para tornar os seus grupos funcionais fortemente eletrofílicos, os quais reagem fortemente com grupos nucleofílicos da enzima (MURTY et al., 2002). A vantagem deste método é a resistência da ligação, estabilidade da enzima imobilizada, não ocorrendo perda da enzima para a solução mesmo na presença de soluções de alta força iônica (BRADY e JORDAAN, 2009). Além disso, a enzima imobilizada apresenta maior especificidade e seletividade, bem como redução na inibição (BLANCO et al., 2007). As desvantagens deste processo são o alto custo e baixo rendimento, uma vez que a conformação da enzima e a atividade são fortemente influenciadas pela ligação covalente. A lipase de *C. rugosa* covalentemente ligada em uma membrana fibrosa de poli(acrilonitrila-co-2-hidroxietil metacrilato) reteve, aproximadamente, 40% da atividade inicial (HUANG et al., 2008). Neste procedimento, a atividade da enzima caiu constantemente com o reuso, devido à desnaturação durante o processo, sendo que a atividade residual da enzima foi de 60% após 30 dias de armazenamento a 4 °C.

A imobilização por adsorção ocorre por meio de interações iônicas ou hidrofóbicas. Vários materiais podem ser utilizados com este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção e custo (DALLA-VECHIA et al., 2004). A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos foi estudada utilizando octil agarose, octadecil-*Sepabeads*, silicatos e vidros hidrofobicamente revestidos, hidrofobinas, etc (PALOMO et al., 2003). Este método é relativamente simples e barato, pode ser utilizado com baixa força iônica (5-25 mM tampão fosfato) e não modifica quimicamente a enzima, mas apresentam algumas limitações como a lixiviação da enzima em solventes aquosos e imobilização pelo sítio ativo com perda da atividade (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; MATEO et al., 2007; BRADY e JORDAAN, 2009). Adsorção hidrofóbica de lipases em suportes em que o invólucro é coberto por uma camada espessa de compostos hidrofóbicos permite que a enzima reconheça esses suportes como uma interface lipídeo-água, ocorrendo o fenômeno de ativação interfacial durante a imobilização, podendo ser observado, muitas vezes, uma hiperativação da enzima como consequência deste processo de imobilização, que promove estabilização da forma ativa da enzima (PALOMO et al., 2002; CUNHA et al., 2008).

A imobilização por adsorção iônica em DEAE-celulose de uma lipase produzida por *Scytalidium thermophilum* apresentou boa estabilidade a estocagem, atividade em uma ampla faixa de pH, entre 4,5 e 9,0, foi praticamente insensível à temperatura de reação entre 35 e 50 °C, sendo sua atividade estimulada cerca de 3 vezes em presença de n-hexano na concentração de 80% (v/v) (LAZARI, 2010).

No método de **auto-imobilização** a enzima é imobilizada sem suporte, usando ligantes bifuncionais capazes de fazer ligações cruzadas, como o glutaraldeído, onde os ligantes unem covalentemente as moléculas de enzima uma às outras. Este método possibilita obter alta atividade específica e volumétrica (BRADY e JORDAAN, 2009). As desvantagens do método são rendimentos muito baixos de imobilização, baixa reprodutibilidade, baixa retenção da atividade, ausência de propriedades mecânicas e fraca estabilidade (MURTY et al., 2002; SHELDON et al., 2007). Utilizando este método, uma lipase de *C. rugosa* foi imobilizada em membranas hidrofílicas e hidrofóbicas, utilizando glutaraldeído como agente ligante (HILAL et al., 2004). A atividade variou significativamente dependendo da membrana e da concentração do ligante, o qual serviu tanto como agente de precipitação da lipase como agente de ligação cruzada. Gupta et al. (2009) sintetizaram um agregado de enzima por

ligação cruzada de uma lipase de *Thermomyces lanuginosa* também utilizando glutaraldeído como agente ligante. Esta preparação foi muito estável e pode ser utilizada por 10 ciclos com perda mínima de atividade.

Assim, a imobilização de lipases oferece soluções favoráveis para muitas aplicações biotecnológicas, como a estabilização da estrutura da enzima, permitindo que suas aplicações em condições adversas de pH, temperatura e solventes orgânicos sejam possíveis em ambiente industrial (KNEZEVIC et al., 2004).

6. Caracterização de lipases microbianas

A caracterização bioquímica das lipases microbianas tem sido amplamente relatada, especialmente as propriedades importantes para as aplicações industriais. As propriedades gerais das lipases microbianas, incluindo peso molecular, ponto isoelétrico (pI), pH e temperatura ótimos e estabilidade estão resumidas na **Tabela 2**. Os efeitos de vários fatores sobre a atividade, estabilidade e especificidade dessas enzimas, como substrato, especificidade posicional, efeitos de íons metálicos, surfactantes e inibidores, atividade e estabilidade em solventes orgânicos podem determinar sua adequação para o uso em diferentes ambientes e indústrias (CONTESINI et al., 2010; LI e ZHONG et al., 2010).

6. 1. Agregação de lipases

A agregação das lipases é uma dificuldade frequentemente relatada nos estudos de purificação destas enzimas (LIMA, 2004) e pode ocorrer devido à presença de uma superfície hidrofóbica composta por seus respectivos aminoácidos (SUGIMURA et al., 2000) ou devido a presença de materiais hidrofóbicos, tais como lipídios, no meio de cultivo (STUER et al., 1986). Fernández-Lorente et al. (2003) e Wilson et al. (2006) relataram que as lipases podem formar agregados bimoleculares pela adsorção entre lipases na forma aberta, devido a grande cavidade hidrofóbica formada ao redor do sítio ativo. Estes agregados geralmente apresentam propriedades catalíticas completamente diferentes, quando comparados às moléculas de lipases individuais (VAKHLU et al., 2006).

O comportamento de agregação da lipase de *C. rugosa* foi estudado com o auxílio de cromatografia de exclusão molecular, eletroforese desnaturante, técnica de fluorescência e espectroscopia de dicroísmo circular (LIOU et al., 1998). O perfil da atividade lipase eluída de uma coluna de Sephadex G200 mostrou quatro picos com atividade lipase de massa molecular aparente de 440, 240, 130 e 60 kDa. A análise em gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) indicou a presença de uma única banda de 60 kDa para os quatro picos anteriormente identificados. Dessa forma, foi comprovada a agregação da lipase de *C. rugosa*, sendo demonstrado também que a agregação influencia fortemente a ligação interfacial e o comportamento catalítico, uma vez que, o pico 1 (polímero) apresentou atividade específica de 3,14 U/mg proteína, o pico 2 (tetrâmero) apresentou atividade de 1,72 U/mg, o pico 3 (dímero), atividade de 1,11 U/mg, enquanto que o pico 4 (monômero), apresentou atividade específica de 0,86 U/mg.

6. 2 Propriedades bioquímicas de lipases microbianas

As lipases microbianas são enzimas cujas formas monoméricas apresentam massas moleculares que variam de 20 kDa a 94 kDa (**Tabela 2**). A lipase de *Yarrowia lipolytica* apresentou massa molecular de 20 kDa por eletroforese desnaturante (SDS-PAGE). Inicialmente, essa enzima apresentou massa molecular aparente de 400 kDa por filtração em gel, indicando que houve formação de um agregado de 20 unidades (SATHISH YADAV et al., 2011).

C. antarctica produziu duas lipases com massas moleculares distintas: lipase A (CalA) de 45 kDa (DIMITRIJEVIC et al. 2012) e lipase B (CalB) de aproximadamente 33 kDa (YAO et al., 2011). As lipases A e B produzidas por *C. cylindracea* apresentaram, respectivamente, massas moleculares de 64 kDa e 62 kDa (RÚA et al., 1993). As lipases Lip 2 e Lip 3 produzidas por *C. rugosa* apresentaram massas moleculares de 58 kDa e 62 kDa, respectivamente, quando analisadas por SDS-PAGE. Essas mesmas lipases, contudo, apresentaram massas moleculares de 34 kDa e 38 kDa, respectivamente, quando analisadas por filtração em gel (PERNAS et al., 2000). Massas moleculares anormais estimadas por cromatografia de filtração em gel são comuns também para glicoproteínas (DUBIN et al., 1993).

Muitas lipases microbianas apresentam atividades ótimas em pH neutro ou alcalino e em temperaturas moderadas (**Tabela 2**). Lipases com atividade ótima em pH ácido e nos extremos de temperaturas, oriundas de psicrófilos ou termófilos, tem sido relatadas. Entre essas, algumas estão sendo utilizadas em importantes aplicações industriais (FUCIÑOS et al., 2005; MHETRAS et al., 2009). Benjamin e Pandey (2001) isolaram três isoformas de lipases produzidas por *C. rugosa* DMS 2031. A isoforma Lip A apresentou atividade ótima em pH 7,0, enquanto Lip B e Lip C mostraram atividades ótimas entre 7,0 e 8,0. As três isoformas dessa lipase apresentaram atividades ótimas entre 35 – 40 °C, sendo que Lip B foi mais termoestável nas temperaturas de 45 – 50 °C, enquanto que as isoformas Lip A e Lip C apresentaram melhores termoestabilidades entre 35 – 45 °C. A lipase produzida por *Mucor* sp. foi ativa na faixa de pH 5,0 – 9,0, com atividade ótima em pH 7,0. Essa enzima apresentou 87% de sua atividade na faixa de pH 5,0 – 7,0 após 24 h, sendo que abaixo de 5,0 ou acima de 9,0 a atividade foi bruscamente reduzida, não sendo observada atividade nos pH 3,0 e 9,0 após esse período de incubação. Essa enzima foi mais ativa na temperatura de 35 °C e estável entre as temperaturas de 30 – 45 °C, com atividade residual acima de 50% da atividade inicial (ABBAS et al., 2002).

Lipases ácidas foram caracterizadas em *Aspergillus niger* (MHETRAS et al., 2009), *Penicillium* sp. (DHEEMAN et al., 2011), *Pseudomonas gessardii* (RAMANI et al., 2010) e *Yarrowia lipolytica* (SATHISH YADAV et al., 2011). *A. niger* produziu uma lipase com atividade ótima em pH 2,5, sendo que em pH 1,5 a atividade foi de 75%, enquanto que, em pH 4,0 houve uma redução de 50% de sua atividade (MHETRAS et al., 2009). Essa enzima foi extremamente estável após 5 dias de incubação na faixa de pH 8,0 – 11,0, retendo 100% de sua atividade; porém, na faixa de pH ácido foram observados apenas 10% de sua atividade. A temperatura ótima de atividade para a lipase de *A. niger* foi de 50 °C, sendo que a 70 °C houve uma forte redução de sua atividade com perda de quase 95% da sua atividade original. A lipase foi estável a 40 °C por 3 dias, enquanto que a 50 °C houve a redução de 52% da atividade original após 1 h de incubação. *Penicillium* sp. DS 39 produziu uma lipase que apresentou pH ótimo de 5,5, e estabilidade na faixa de pH 5,0 – 6,0 (acima de 95% de atividade) após 24 h de incubação (DHEEMAN et al., 2011). A atividade ótima da lipase produzida por *Y. lipolytica* foi observada em pH 5,5 e temperatura de 25 °C (SATHISH YADAV et al., 2011). Essa enzima foi estável na faixa de pH 4,0 - 6,0 e na faixa de temperatura de 10 °C – 30 °C, sendo que acima dessa temperatura a atividade da enzima foi praticamente nula.

Tabela 2. Propriedades bioquímicas gerais de lipases microbianas.

Micro-organismo	MM (kDa)	pI	pH ótimo	T(°C) ótima	Estabilidade	Referências
<i>Candida antarctica</i> Lipase A	45	-	-	60	Estável a 60 °C após 4 h. Meia vida a 65, 70, 75 e 80 °C igual a 3,0, 1,24, 0,34 e 0,14 h, respectivamente.	Dimitrijević et al. (2012)
<i>Candida antarctica</i> Lipase B	~33	-	-	-	-	Yao et al. (2011)
<i>Candida cylindracea</i> Lipase A	64	5,5	7,0	-	Lipase A foi estável no pH 7,2 e a 30 °C por 4 dias.	Rúa et al. (1993)
Lipase B	62	4,9	7,0	-	Lipase B foi estável no pH 7,2 e a 30 °C por 1,5 dias.	
<i>Candida rugosa</i> lipase B Lip 1	-	4,8	7,0	30	As lipases foram estáveis na faixa de pH 5,0 e 7,0. A estabilidade térmica a 40 °C foi semelhante para as lipases.	López et al. (2000)
lipase B Lip 2	-	4,7	7,0	30		
<i>Candida rugosa</i> Lip 2	58	4,9	8,0	-	-	Pernas et al. (2000)
Lip 3	62	5,5-5,8	8,0	-	-	
<i>Burkholderia multivorans</i>	30	-	-	-	-	Gupta et al. (2005)
<i>Aeromonas caviae</i> AU04	39	-	7,0	60	Variação do pH teve pouco efeito sobre a estabilidade. A enzima reteve 98% e 75% de sua atividade a 40 e 50 °C após 3 h.	Velu et al. (2012)
<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3639	20	-	5,0	25	Estável na faixa de pH 4 – 6. Pouca estabilidade em pH alcalino. Estável na faixa de 10 – 30 °C.	Sathish Yadav et al. (2011)
<i>Mucor</i> sp.	42	6,2	7,0	35	Estável em faixa de pH 5 – 7 após 24 h. A enzima reteve acima de 50% da atividade de 30 – 45 °C após 1 h	Abbas et al. (2002)

Tabela 2. Continuação.

Micro-organismo	MM (kDa)	pI	pH ótimo	T(°C) ótima	Estabilidade	Referências
<i>Geotrichium</i> sp. SYBC WU-3 LipA	41,1	-	9,5	20	Mais estável na faixa de pH 6 – 9. Reteve 100% atividade a 40 °C após 1 h	Cai et al. (2009)
LipB	35,8	-	9,5	15	Reteve 80% da atividade em pH 8,0. Reteve 80% da atividade a 40 °C após 1 h.	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	40	3,8	8,0	45	A enzima foi estável a 25 °C.	Ferrer et al. (2000)
<i>Penicillium cyclopium</i> Lipase I	29	-	8-10	-	90% da atividade residual depois de 1 h em pH 8 e 35 °C; perdeu atividade após 10 min. a 45 °C	Ibrik et al. (1998)
<i>Penicillium cyclopium</i> Lipase II	40-43	-	7,0	40	Estável nas temperaturas de 20 – 40 °C em pH 7,0; estável na faixa de pH 4,5 – 7,0.	Chahinian et al. (2000)
<i>Penicillium</i> sp. DS-39	43	-	5,5	45	95% atividade em pH 5,0-6,0 após 24 h e 90% e 50% em 45 °C e 50 °C após 3 h	Dheeman et al. (2011)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 1207	32,2	-	2,5	50	Reteve 100% da atividade em pH alcalino (8,0 – 10,0) após 24 h. Estável a 40 °C por 3 h.	Mhetras et al. (2009)
<i>Pseudomonas gessardi</i>	94,0	-	3,5	-	Estável na faixa de pH 1,0 – 5,5	Ramani et al. (2010)

As lipases ativas em temperaturas baixas estão despertando interesse devido às suas aplicações nas indústrias farmacêuticas, de síntese de produtos de química fina, de alimentos, de produtos domésticos e aplicações ambientais, porque suas baixas temperaturas ótimas e elevadas atividades em temperaturas baixas são características favoráveis para produção de substâncias relativamente instáveis ou frágeis (JOSEPH et al., 2007). *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 produziu duas lipases com atividades ótimas a 20 °C (LipA) e a 15 °C (LipB) e estáveis por longo período a 25 °C (CAI et al., 2009). O pH ótimo das lipases foi de 9,5 e as suas estabilidades foram de 60% (LipA) e 40% (LipB) em pH 8,0 após 24 h de incubação. *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. produziu lipase com atividade ótima a 25 °C, mas também com alta atividade nas temperaturas de 5 °C a 15 °C. A energia de ativação dessa enzima foi de 2,07 Kcal/mol entre as temperaturas de 5 °C a 25 °C, indicando que a enzima se tratava de uma típica lipase adaptada ao frio (RYU et al., 2006). O pH ótimo dessa enzima foi 9,0 em temperatura de 30 °C e permaneceu razoavelmente estável de pH 5,0 a 11,0 após 30 min. de incubação.

As lipases microbianas termoestáveis são comercialmente significantes para uso industrial em síntese orgânica e nas indústrias de alimentos (LI e ZHANG et al., 2005). Entre as lipases termoestáveis estudadas encontram-se as dos gêneros *Bacillus* (SINCHAIKUL et al., 2001; SHARMA et al., 2002; AHMAD et al., 2008), *Geobacillus* (LI e ZHANG, 2005; TAYYAB et al., 2011), *Thermus* (DOMÍNGUEZ et al., 2007), *Penicillium* (GUTARRA et al., 2009; LI e ZHONG, 2010) e *Aspergillus* (SAXENA et al., 2003a). *Thermus thermophilus* HB27 produziu uma lipase com atividade ótima e alta estabilidade térmica a 85 °C por várias horas. O pH ótimo de atividade pareceu estar entre 6,0 e 7,0, mas continuou a aumentar em regiões mais alcalinas (FUCIÑOS et al., 2005).

7. Aplicações de lipases microbianas

Devido à versatilidade das lipases microbianas de promover grande número de reações em temperatura ambiente ou moderada e em pressões moderadas, o uso dessas enzimas em aplicações industriais como reações de hidrólises, bioconversões e sínteses aumentou significativamente nos últimos anos, sendo as principais aplicações nas indústrias de alimentos, detergentes e farmacêuticas (HOUDE et al., 2004; ARAVINDAN et al., 2007; HASAN et al., 2010).

Na indústria de alimentos, as lipases são utilizadas para a formulação de alimentos mais nutritivos a partir da síntese de lipídios estruturados (HOUDE et al., 2004). Os lipídios estruturados são óleos ou gorduras modificados para adquirir propriedades físicas e nutricionais melhoradas para a utilização em alimentos como margarinas. Essas modificações incluem mudanças na composição de ácidos graxos, mudanças nas posições dos ácidos graxos no triacilglicerol e mudanças no comprimento da cadeia dos ácidos graxos, bem como no número e posição das insaturações (CARVALHO et al., 2003, KAUSHIK et al., 2010).

O emprego de lipases durante o processo de fabricação de alimentos pode acentuar seus sabores ou aromas devido à hidrólise de ésteres de ácidos graxos presentes no processo. Abbas e Comeau (2003) estudaram a síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta a partir de uma lipase imobilizada produzida por uma linhagem de *Mucor* sp. Hernández et al. (2005) avaliaram as modificações do aroma e sabor durante a fabricação artesanal de queijos de cabra, por aplicação de lipases microbianas. Esses autores observaram que o uso de 8 U de lipase para 50 L de leite resultou em aumento de 80% na liberação de ácidos graxos de cadeia curta, o que conferiu aos queijos tipo Idiabazal um aroma acre e intenso.

O uso de lipases na indústria de detergentes representa a principal aplicação dessas enzimas. As lipases destinadas à formulação de detergentes são especificamente selecionadas com relação à baixa especificidade pelo substrato, alta atividade em baixas temperaturas, estáveis em condições alcalinas, na presença de surfactantes e de outras enzimas, como proteases, normalmente presentes em tais formulações (HASAN et al., 2010). Devido a importância das lipases nesse setor industrial, novos micro-organismos são estudados visando a produção de lipases para esta aplicação, incluindo técnicas moleculares para o melhoramento da produção das lipases (HORCHANI et al., 2009).

Prazeres et al. (2006) estudaram a aplicação de uma lipase alcalina produzida por *Fusarium oxysporum* em detergentes comerciais. Essa lipase foi compatível com vários surfactantes iônicos e não-iônicos e detergentes comerciais. Além disso, essa enzima apresentou ampla especificidade por substrato, estabilidade em pH alcalino e em alta temperatura. Os efeitos da temperatura, pH e vários componentes de detergentes sobre a atividade e estabilidade de uma lipase produzida por *Fusarium solani* N4-2 foram estudados para uma avaliação preliminar à formulação de detergentes (LIU et al., 2009). Comparada com a preparação comercial Lipolase[®], essa enzima mostrou maior estabilidade em

surfactantes iônicos e não-iônicos, detergentes comerciais, agentes oxidantes e maior resistência à degradação por proteases.

A aplicação de lipases na indústria farmacêutica apresenta várias vantagens sobre a síntese química, como enantiosseletividade, regioseletividade, condições moderadas de reação que evita isomerização, racemização, epimerização, reações de rearranjos, reutilização de biocatalizadores imobilizados, economia no processo e mutagênese das enzimas para funções específicas (HOUDE et al., 2004; KENNEDY et al., 2006). As lipases microbianas também são utilizadas na indústria farmacêutica para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados livres e seus monoglicerídeos e diglicerídeos, necessários para a síntese normal dos lipídios da membrana plasmática e de prostaglandinas (ARAVINDAM et al., 2007).

Sakaki et al. (2001) utilizaram lipases de *Candida rugosa* imobilizadas em reatores de membrana para resolução de ésteres metílicos de (R,S) naproxeno. Naproxeno, um derivado do ácido propiônico, é um anti-inflamatório não esteróide, inibidor da ciclooxigenases 1 e 2. A imobilização da enzima e as condições operacionais estabelecidas nesse estudo possibilitou a obtenção de um excesso do enantiômero S-naproxeno de 92%. Kahveci e Xu (2011) avaliaram um processo repetitivo de hidrólise do óleo de salmão empregando lipase de *C. rugosa* para o enriquecimento de ácidos graxos poli-insaturados da família ômega 3, como ácido ecosapentaenóico e ácido docosaexaenóico. Esses compostos são amplamente empregados na elaboração de produtos nutracêuticos e farmacêuticos utilizados na prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, artrites e desordens inflamatórias e autoimunes (RIEDIGER et al., 2009).

As aplicações industriais das lipases estão contribuindo para um contínuo aumento do mercado mundial de enzimas, uma vez que as lipases estão entre as enzimas mais utilizadas em processos industriais (HOUDE et al., 2004). A produção de biodiesel catalisada por lipases microbianas é uma tendência para os próximos anos na tentativa de substituir as vias químicas de síntese, e reduzir os custos de produção. Essa apresenta algumas vantagens sobre a catálise química como menor gasto de energia, permite fácil recuperação de glicerol e da transesterificação de triglicerídeos com elevados teores de ácidos graxos livres. (BAJAJ et al., 2010). Contudo, segundo Fjerbaek et al. (2009) os custos da enzima por quilograma de éster produzido ainda permanece superior, quando comparado aos custos dos catalisadores alcalinos.

Biopolímeros como polifenóis, polissacarídeos e poliésteres estão recebendo maior atenção das indústrias devido ao considerável grau de diversidade, complexidade e por serem biodegradáveis e produzidos com recursos naturais renováveis (JAEGER e EGGERT, 2002). As lipases são utilizadas no processo de síntese de ésteres com grandes vantagens por serem altamente seletivas em condições moderadas de trabalho. Entre as limitações e problemas de produção estão os custos e a disponibilidade das enzimas, pequena diversidade de substratos, a quantidade de catalisador utilizado para o rendimento do processo, etc (KOBAYASHI, 2010).

A presença de óleos e gorduras em águas residuárias de indústrias de processamento de alimentos como laticínios, abatedouros e cervejarias causam problemas em todas as etapas do tratamento de seus efluentes (MENDES et al., 2005). A aplicação de lipases no tratamento de efluentes apresenta algumas vantagens como simplicidade e facilidade no controle do processo, não havendo necessidade de aclimatação da biomassa, nem efeitos por choque de cargas de poluentes, operando em ampla faixa de pH, temperatura e salinidade (KARAM e NICELL, 1997).

8. Fontes produtoras de lipases

Lipases ocorrem amplamente na natureza, mas aquelas de origem microbiana são comercialmente atrativas por causa do baixo custo de produção, alta estabilidade, maior diversidade e disponibilidade (ARAVINDAN et al., 2007). Essas enzimas também se destacam por serem extracelulares e apresentarem alta quimiosseletividade, regiosseletividade e estereosseletividade (BEISSON et al., 2000).

Novos micro-organismos produtores de lipases ou lipases recombinantes de linhagens de *Candida rugosa*, *C. cylindracea*, *C. antarctica*, *C. utilis*, *Pseudomonas* sp. ou *Rhizopus* spp. (SCHIMIDT-DANNERT et al., 1998; RUCHI et al., 2008; PUSKAS et al., 2011) com características bioquímicas melhoradas podem reduzir os custos de produção em grandes quantidades ou promover a obtenção de um produto mais puro para determinadas aplicações industriais (SCHIMIDT-DANNERT, 1998).

Novas lipases foram produzidas por micro-organismos extremófilos, incluindo espécies termófilas e psicrófilas de amostras ambientais. Várias amostras microbianas isoladas de solo foram analisadas por seleção em meios sólido e líquido para a produção de lipases, revelando que aproximadamente 20% foram produtoras de lipase (KO et al., 2005, FREGOLENTE et al., 2009; GRIEBELER et al., 2011). A identificação taxonômica resultou na descrição de espécies microbianas desconhecidas produtoras de lipases, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (**Tabela 3**). Estas lipases foram extensivamente caracterizadas com respeito a sua atividade hidrolítica e de síntese, bem como sua enantiosseletividade para substratos artificiais, como ácidos carboxílicos, alcoóis, aminas e resolução de racêmicos (LIN et al., 2006a; MESSIAS et al., 2009; ROMDHANE et al., 2010; BOUAZIZ et al., 2011).

Tabela 3. Novas linhagens de micro-organismos produtores de lipases.

Micro-organismos	Fonte	Propriedades / Aplicação	Referências
<i>Talaromyces thermophilus</i>	Fungo	Alcalina, termoativa /detergentes de lavanderia	Rondhane et al. (2010)
<i>Botryosphaeria ribis</i>	Fungo	Alcalina, alta estabilidade em solventes orgânicos	Messias et al. (2009)
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	Fungo	Alcalina / hidrólise de óleos vegetais	Balaj e Ebenezer (2008)
<i>Pichia lynferdii</i>	Levedura	Ativa em baixas temperaturas	Kim et al. (2010)
<i>Pseudozyma hubeiensis</i>	Levedura	Ácida, termoestável / aumento da atividade em detergentes e compostos quelantes	Bussamara et al. (2010)
<i>Cryptococcus</i> spp.	Levedura	Simetria-assimetria de proquirais propanodiol	Lin et al. (2006)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Bactéria	Alcalina, termorresistente	Bouaziz et al. (2011)
<i>Sphingobacterium multivorum</i>	Bactéria	Transesterificação	Li et al. (2010)
<i>Fervidobacterium nodosum</i>	Bactéria	Alcalina, termófila, resistente a solventes e íons metálicos	Yu et al. (2010)

9. *Candida viswanathii*: descrição, fisiologia e aplicações biotecnológicas.

A linhagem *Candida viswanathii* foi primeiramente isolada e identificada do fluido cefalorraquidiano de um caso fatal de meningite (VISWANATHAN e RANDHAWA, 1959). Posteriormente, a mesma espécie foi novamente isolada a partir de escarros durante investigações micológicas de rotina em materiais clínicos (SANDHU e RANDHAWA, 1962). Mais tarde, estudos em animais de laboratório indicaram que a patogenicidade de *C. viswanathii* é variável entre as cepas isoladas (SANDHU et al., 1965). Atualmente, casos isolados de infecção por *C. viswanathii* são relatados na literatura, sendo que esta espécie é algumas vezes, associada a outros micro-organismos patogênicos (MARTINS et al., 2009).

As colônias de *C. viswanathii* cultivadas em ágar glicose e peptona a 25 °C, após três dias, apresentam-se com coloração creme, esféricas, sem brilho, lisas ou enrugadas, tornando-se mais enrugadas com projeções capilares em incubação mais prolongada. As células apresentaram-se arredondadas, ovais ou cilíndricas com tamanhos que variaram de 1,4 – 6,0 x 2,0 – 10,8 µ. As células podem ser únicas ou formando cadeias ramificadas de células alongadas irregulares (**Figura 12**).

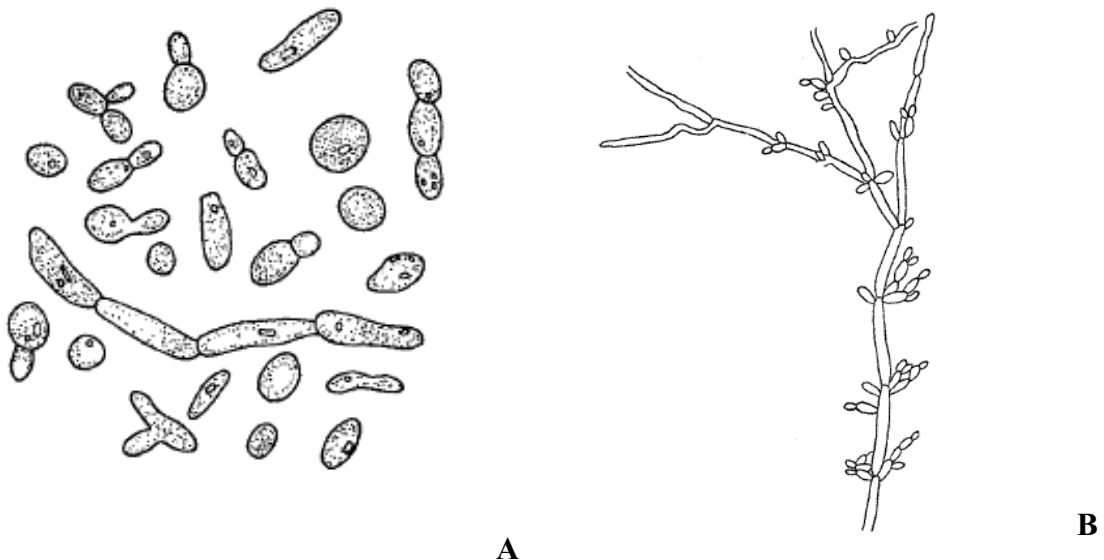


Figura 12. Células de *Candida viswanathii* (A) cultivadas por três dias em extrato de malte a 27 °C e (B) pseudomicélio desenvolvido em meio batata dextrose ágar (SANDHU e RANDAWA, 1962).

C. viswanathii é capaz de assimilar as fontes de carbono D-glicose, maltose, D-galactose, trealose, celobiose, D-salicina, arbutina, melezitose, sacarose, amido, glicerol, ribitol, xilitol, D-glucitol, entre outras e fermentar glicose, galactose, maltose e muito fracamente sacarose e lactose (BARNETT et al., 2000). Entre as fontes de nitrogênio comumente utilizadas em meio de cultura, esta espécie não assimila nitrato de potássio e ureia (SANDHU e RANDHAWA, 1962). Baseado nas análises de sequências de genes D1/D2 LSU do rRNA e reassociação do DNA nuclear, *C. viswanathii* apresenta as seguintes sinonímias: *Trichosporum lodderae*, *Fermentotrichon lodderae*, *Candida lodderae* e *Candida aquaetextoris* (KURZTMAN et al. (2011).

Os primeiros trabalhos envolvendo aplicação biotecnológica de *C. viswanathii* foram realizados na Índia, onde um grupo de pesquisadores isolou uma linhagem de solo enriquecido com acetofenona como única fonte de carbono para a produção de oxidorreduases (SONI et al., 2005). Na ocasião, foi estudada a redução estereosseletiva de heteroarilmetilcetonas para a síntese de (S)- α -(3-piridil)etanol e de S(-)-1-(1'-naftil)etanol, importantes intermediários na síntese de alcalóides ativos de importância farmacêutica (SONI et al., 2005; KAMBLE et al., 2005). Estudos posteriores foram desenvolvidos para a otimização da produção de carbonil redutase de *C. viswanathii* e a purificação desta enzima (SONI et al., 2005; FATIMA et al., 2007; SONI et al., 2007a; SONI et al., 2007b). Mais recentemente, foi desenvolvido um estudo visando o emprego da carbonil redutase de *C. viswanathii* em um sistema aquoso-solvente orgânico para aumentar seu potencial biocatalítico (KANSAL et al., 2009).

10. REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 32, p. 589–595, 2003.
- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 31, p. 968–975, 2002.
- ABOUSALHAM, A.; VERGER, R. Zymogram of pancreatic lipases. **Analytical Biochemistry**, vol. 281, p. 234–236, 2000.

- AÇIKEL, Ü.; ERSANA, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 88, p. 31–39, 2010.
- AHMAD, S. KAMAL, Z.; SANKARANARAYANAN, R.; RAO, N. M. Thermostable *Bacillus subtilis* lipases: In vitro evolution and structural insight. **Journal of Molecular Biology**, vol. 381, p. 324–340, 2008.
- ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J.A.; FERNANDEZ, S.; VAN OOSTERHOUT, D.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1761, p. 995–1013, 2006.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, vol. 34, p. 1185–1194, 2009
- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, vol. 6, p. 141-158, 2007.
- ARNAU, C.; RAMON, R.; CASAS, C.; VALERO, F. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 46, p. 494–500, 2010.
- BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P.N.; MEHROTA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 9-14, 2010.
- BALAJI, V.; EBENEZER, P. Optimization of extracellular lipase production in *Colletotrichum gloeosporioides* by solid state fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, vol.1, n. 7, p. 1-8, 2008.
- BAPIRAJU, K. V. V. S. N.; SUJATHA, P.; ELLAIAH, P.; RAMANA, T. Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus* sp. BTNT-2. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 45, n. 4, p. 257–273, 2005.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: characterization and identification**. Cambridge University Press, New York, 2o. ed., 2000, 1150p.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A. Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.
- BEISSON, F.; FERTÉ, N.; NARI, J.; NOAT, G.; ARONDEL, V.; VERGER, R. Use of naturally fluorescent triacylglycerols from *Parinari glaberrimum* to detect low lipase activities from *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Journal of Lipid Research**, vol. 40, p. 2313–2321, 1999.

- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Sciences and Technology**, vol. 2, p. 133-153, 2000.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 881- 896, 2003.
- 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**, vol. 44, n. 2, p. 213 – 221, 2001.
- BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; MUNOZ, N.; SERRA, E. Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support. **Journal Molecular Catalysis B: Enzyme**, vol. 47, p. 13 - 20, 2007.
- BOTHNER, B.; CHAVEZ, R.; WEI, J.; STRUPP, C.; PHUNG, Q.; SCHNEEMANN, A.; SIUZDAK, G. Monitoring enzyme catalysis with mass spectrometry. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 275, n. 18, p. 13455–13459, 2000.
- BOUAZIZ, A.; HORCHANI, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Expression, purification of a novel alkaline *Staphylococcus xylosus* lipase acting at high temperature. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 54, p. 93–102, 2011.
- BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnol Letters**, vol. 31, p. 1639–1650, 2009.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 268–275, 2010.
- CAI, Y.; WANG, L.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 786–790, 2009.
- CAJAL, Y.; SVENDSEN, A.; DE BOLÓS, J.; PATKAR, S. A.; ALSINA, M. A. Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. **Biochimie**, vol. 82, p. 1053–1061, 2000.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, vol. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, vol. 27, no. 1, p. 146-156, 2004.
- CAVALCANTI, E.D.A.C; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.48, p. 79-84, 2005.

- CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L-C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, vol 64, n. 2, p. 215-222, 2000.
- CHAHINIAN, H.; NINI, L.; BOITARD, E.; DUBES, J. P.; COMEAU, L. C.; SARDA, L. Distinction between esterases and lipases: a kinetic study with vinyl esters and TAG. **Lipids**, vol. 37, no. 7, p. 653-662, 2002.
- CHEMNITIUS, G.C.; ERDMAN, H.; SCHINID, R.D. Solubilized substrates for the on-line measurement of lipases by flow-injection analysis during chromatographic enzyme purification. **Analytical Biochemistry**, vol. 202, p. 16–24, 1992.
- CHENNUPATI, S.; POTUMARTHI, R.; RAO, M. G.; MANGA, P. L.; SRIDEVI, M.; JETTY, A. Multiple responses optimization and modeling of lipase production by *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737 using response surface methodology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, vol. 159, p. 317–329, 2009.
- CHERUKUVADA, S.; SESHASAYEE, A. S. N.; RAGHUNATHAN, K.; ANISHETTY, S.; PENNATHUR, G. Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: insights from molecular dynamics simulations. **PLoS Computational Biology**, vol. 1, n. 3; p. e28, 2005.
- CHRISTENSSON, B.; FEHRENBACH, F. J.; HEDSTRÖM, S. A. A new serological assay for *Staphylococcus aureus* infections: detection of IgG antibodies to *S. aureus* lipase with an enzyme-linked immunosorbent assay. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 152, n. 2, 1985.
- CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol. 20, p. 193–197, 2004.
- COLIN, V.L.; BAIGORI, M.D.; PERA, L.M. Effect of environmental conditions on extracellular Lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 50, p. 52–58, 2010.
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 67, p. 163–171, 2010.
- CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAILI-ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 5, p. 75–78, 1998.
- COSTA, V.E.U.; AMORIM, H.L.M. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, vol. 22, n. 6, p. 863-873, 1999.

- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, vol. 76, p. 291–302, 2006.
- CUNHA, A. G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; PAIVA, L. M. C.; FREIRE, D. M. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIÁN, J. M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 146, p. 49–56, 2008.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quimica Nova**, vol. 27, no. 4, p. 623-630, 2004.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme Microbial and Technology**, vol. 26, p. 657-663, 2000.
- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C. FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A. R.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 39, p. 676-681, 2008.
- DANDEVATE, V.; JINJALA J.; KEHARIA, H. D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, vol. 100, n. 13, p. 3374-3381, 2009.
- DAVE, R.; MADAMWAR, D. Entrapment of lipase in polymer of polyvinyl alcohol-boric acid for esterification in organic media. **Indian Journal of Biotechnology**, vol. 5, p. 368-372, 2006.
- DAVRANOV, K.; KHALAMEIZER, V. B. Current state of the study of Microbial lipases. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 33, n. 2, p. 113-126, 1997.
- DHEEMAN, D.S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J.M.; HENEHANA, G.T.M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, p. 256-262, 2011.
- DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N.P.; VARGAS, G.L.P.; FREIRE, D.M.G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 113–116, 2004.
- DIMITRIJEVIC, A.; VELICKOVIC, D.; BIHELOVIC, F.; BEZBRADICA, D.; JANKOV, R.; MILOSAVIC, N. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. **Bioresource Technology**, vol. 107, p. 358–362, 2012.
- DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F. J.; SANROMAN, M. A.; LONGO, M. A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 78, p. 1166–1170, 2003.
- DOMÍNGUEZ, A.; FUCIÑOS, P.; RÚA, M. L.; PASTRANA, L.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A.; Stimulation of novel thermostable extracellular lipolytic enzyme in cultures of *Thermus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, p. 187–194, 2007.

- DUBIN, P. L.; EDWARDS, S. L.; MEHTA, M. S.; TOMALIA, D. Quantitation of non-ideal behavior in protein side-exclusion chromatography. **Journal of Chromatograph**, vol. 635, p. 51–60, 1993
- EDWINOLIVER, N.G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R.B.; GOWTHAMAN, M.K.; NAKAJIMA KAMBE, T.; KAMINI, N.R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 6791–6796, 2010.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, vol. 36 p. 325-329, 2001.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 367- 372, 2002.
- ERICSSON, D. J., KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS1, T.; SANDSTRÖM, A. G.; BÄCKVALL, J-E.; MOWBRAY, S. L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biology**, vol. 376, p. 109–119, 2008.
- ERTUGRUL, S.; DONMEZ, G.; TAKAC, S.S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal Hazard Mater**, v.149, p. 720–724, 2007.
- FATIMA, Y.; KANSAL, H.; SONI, P.; BANERJEE, U. C. Enantioselective reduction of aryl ketones using immobilized cells of *Candida viswanathii*. **Process Biochemistry**, vol.42, p. 1412–1418, 2007.
- FENG, Y.; KLEE, D.; HÖCKER, H. Lipase catalyzed copolymerization of 3(S)-isopropylmorpholine-2,5-dione and D,L-lactide. **Macromolecular Biosciences**, vol. 4, p.587–590, 2004.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 93, p. 185–197, 1998.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 82, n. 2, 2003.
- FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzimology**, vol. 284, p. 327-347, 1997.
- FERRER, M.; PLOU, F. J.; NUERO, O. M.; REYES, F.; BALLESTEROS, A. Purification and properties of a lipase from *Penicillium chrysogenum* isolated from industrial wastes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 75, p. 569 – 576, 2000.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J.M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, vol. 29, p. 632–644, 2011.

- FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, p. 742–749, 2004.
- FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 102, n. 5, 2009.
- FOJAN, P.; JONSON, P.H.; PETERSEN, M.T.N.; PETERSEN, S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Biochimie**, vol. 82, p. 1033–1041, 2000.
- FRASER, J. E.; BICKERSTAFF, G. F. Entrapment in calcium alginate. **Methods in Biotechnology**, vol. 1, p. 61 – 66, 1997.
- FREGOLENTE, P.B.L.; FREGOLENTE, L.V.; MACIEL, M.R.W.; CARVALHO, P.O. Screening of microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 40, p. 747-756, 2009.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S. SANT' ANNA, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 63-65, p. 409-421, 1997.
- FUCIÑOS, P.; ABADÍN, C. M.; SANROMÁN, A.; LONGOB, M. A.; PASTRANA, L.; RÚA, M. L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization. **Journal of Biotechnology**, vol. 117, p. 233–241, 2005.
- GAIKAIWARI, R. P.; WAGHA, S. A.; KULKARNI, B. D. Efficient lipase purification using reverse micellar extraction. **Bioresource Technology**, 2012.
- GILHAM, D.; LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, vol. 36, p. 139–147, 2005.
- GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Evolutionary and swarm intelligence-based approaches for optimization of lipase extraction from fermented broth. **Engineering Life Science**, vol. 10, n. 3, p. 265–273, 2010.
- GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, INC. Global industrial enzymes market to reach US\$ 3.74 billion by 2015, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc. Disponível em: http://www.strategyr.com/Industrial_Enzymes_Market_Report.asp. Acesso em: 24/02/2012.
- GOMBERT, A.K.; PINTO, A.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, vol. 35, p. 85–90, 1999.
- GRIEBELER, N.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; CECHET, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; RIGO,

- E.; NINOW, J. L. Isolation and screening of lipase-producing fungi with hydrolytic activity. **Food Bioprocess and Technology**, vol. 4, p. 578–586, 2011.
- GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure Applied Chemistry**, vol. 77, n. 1, p. 251–262, 2005.
- GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology Applied Biochemistry**, vol. 37, p. 63–71, 2003.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied and Microbiol Biotechnology**, vol. 64, p. 763–781, 2004.
- GUPTA, N.; RATHI, P.; SINGH, R.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied and Microbiol Biotechnology**, vol. 67, p. 648–653, 2005.
- GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 518–526, 2007.
- GUPTA, P.; DUTT, K.; MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R.K. Characterization of cross-linked immobilized lipase from thermophilic mould *Thermomyces lanuginosa* using glutaraldehyde. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 4074–4076, 2009.
- GUTARRA, M. L. E.; MATEUS, A.; GODOY, G.; MAUGERI, A. F.; RODRIGUES, M. B.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 5249–5254, 2009.
- GUTIÉRREZ-AYESTA, C.; CARELLI, A. A.; FERREIRA, M.L. Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyze triglycerides and phospholipids. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 41, p. 35–43, 2007.
- HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597–607, 1975.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, vol. 27, p. 782–798, 2009.
- HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836–4844, 2010.
- HE, Y-Q.; TAN, T-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99–125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 43, p. 9–14, 2006.
- HERNÁNDEZ, I.; RENOBALLES, M.; VIRTO, M.; PÉREZ-ELORTONDO, F. J.; BARRON, L. J. R.; FLANAGAN, C.; ALBISU, M. Assessment of industrial lipases for flavour

- development in commercial Idiazabal (ewe's raw milk) cheese. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 36, p. 870–879, 2005.
- HILAL, N.; NIGMATULLIN, R.; ALPATOVA, A. Immobilization of cross-linked lipase aggregates within microporous polymeric membranes. **Journal of Membrane Science**, vol. 238, p. 131-141, 2004.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.
- HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, vol. 1, n. 2, p. 209-235, 2000.
- HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 56, p. 237–245, 2009.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 118, p. 155-170, 2004.
- HUANG, X.-J.; YU, A.-G.; XU, Z.-K. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 5459–5465, 2008.
- HUNG, T.-C.; GIRIDHAR, R.; CHIOU, S.-H.; WU, W.-T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 26, p. 69–78, 2003.
- IBRIK, A.; CHAHINIAN, H.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. **Lipids**, vol. 33, n. 4, p. 377-84, 1998.
- IFTIKHAR, T.; NIAZ, M.; NISA, Z. U.; TARIQ, A.; KHALID, M. N.; JABEEN, R. Optimization of cultural conditions for the biosynthesis of lipases by *Penicillium chrysogenum* (mbl 22) through solid state fermentation. **Pakistan Journal Botanical**, vol. 43, n. 4, p. 2201-2206, 2011.
- JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B.W.; REETZ, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review Microbiology**, vol. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K.-E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, vol. 16, p. 396-403, 1998.

- JAMES, J. J.; LAKSHMI, B. S.; SESHASAYEE, A. S. N.; GAUTAM, P. Activation of *Candida rugosa* lipase at alkane–aqueous interfaces: a molecular dynamics study. *FEBS Letters*, vol. 581, p. 4377–4383, 2007.
- JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalyses B Enzyme*, vol. 66, n. 3–4, p. 264–269, 2010.
- JOSEPH, B.; RAMTEKE1, P. W.; THOMAS, G.; SHRIVASTAVA, N. Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, vol. 2, n. 2, p. 39-48, 2007.
- JOSEPH, B.; UPADHYAYA, S.; RAMTEKE, P. Production of cold-active bacterial lipases through semi solid state fermentation using oil cakes. *Enzyme Research*, vol. 2011, p. 1-6, 2011.
- KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry*, vol. 129, p. 1552–1558, 2011.
- KAMBLE, A. L.; SONI, P.; BANERJEE, U. C. Biocatalytic synthesis of *S*(–)-1-(1-naphthyl) ethanol by a novel isolate of *Candida viswanathii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 35, p. 1–6, 2005.
- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. *Process Biochemistry*, vol. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.
- KANSAL, H.; BANERJEE, U. C. Enhancing the biocatalytic potential of carbonyl reductase of *Candida viswanathii* using aqueous-organic solvent system. *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 1041–1047, 2009.
- KAR, T., DELVIGNE, F., MASSON, M., DESTAIN, J., & THONART, P. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale down approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 35, p. 1053–1059, 2008.
- KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemical, Technology and Biotechnology*, vol. 69, n. 141, 1997.
- KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; WASEEM BUTT, B. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 5, n. 10, p. 878-882, 2006.
- KAUSHIK, R.; MARWAH, R. G.; GUPTA, P.; SARAN, S.; SASO, L.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Optimization of lipase production from *Aspergillus terreus* by response surface methodology and its potential for of partial glycerides under solvent free conditions. *Indian Journal Microbiology*, vol. 50, n. 4, p. 456–462, 2010.
- KENNEDY, J. F.; KUMAR, H.; PANESAR, P. S.; MARWAHA, S. S. GOYAL, R.; PARMAR, A.; KAUR, S. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and

- related compounds. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 81, p. 866–876, 2006.
- KNEZEVIC, Z. D.; ŠILER-MARINKOVIĆ S. S.; MOJOVIĆ, LJILJANA V. Immobilized lipases as practical catalysts. **APTEFF**, vol. 35, p. 151-164, 2004.
- KIM, B. S.; HOU, C. T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 29, p. 59–64, 2006.
- KIM, H-R.; KIM, I-H.; HOU, G.T.; KWON, K-I. SHIN, B-S. Production of a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* Y-7723. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 58, p. 1322–1326, 2010.
- KO, W. H., WANG, I. T., & ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganisms in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, vol. 37, p. 597–599, 2005.
- KOBAYASHI, S. Lipase-catalyzed polyester synthesis: green polymer chemistry. **Proceedings Japan Academic**, vol. 86, n. 4, p. 338-365, 2010.
- KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purification and biochemical characterization of an extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. **Ciência Agrotecnica**, v. 30, n. 3, p. 494-502, 2006.
- KOK, R. G.; NUDEL, C.B.; GONZALEZ, R. H.; NUGTEREN-ROODZANT, I. M.; HELLINGWERF, K. J. Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: fatty acid repression of *lipa* expression and degradation of LipA. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 6025–6035, 1996.
- KUMAR, S. S.; GUPTA R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, vol. 43, p. 1054–1060, 2008.
- LAKSHMI, B. B.; KANGUEANE, P.; ABRAHAM, B.; PENNATHUR, G. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). **Letters in Applied Microbiology**, vol 29, p. 66-70, 1999.
- LAZARI, S. A. Caracterização bioquímica da atividade lipásica de *Scytalidium thermophilum* RP-250: uma linhagem hipersecretora de lipases. **Dissertação de mestrado**. Ribeirão Preto – SP. 111p., 2010.
- LI, H.; ZHANG, X. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. *TWI*. **Protein Expression and Purification**, vol. 42, p. 153–159, 2005.
- LI, J.; ZHANG, S.; LIU, G.; ZHAO, R.; XU, H.; QIAO, D.; CAO, Y. Separation and identification of lipase – producing strains and immobilized transesterification efficiency. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 4, n. 6, p. 448-453, 2010.
- LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal Molecular Catalyses B Enzymes**, vol. 66, p. 43–54, 2010.

- LIMA, V. M. G. **Produção e purificação de lipases de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos.** 2004. Tese de doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2004. 151 p.
- LIMA, V.M.G., KRIEGER, N., SARQUIS, M.I.M., MITCHELL, D.A., RAMOS, L.P., FONTANA, J.D. Effect of the nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*, **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p 105-110, 2003.
- LIN, C.; HIRAGA, Y.; MASAKI, K.; IEFUJI, H.; OHKATA, K. Temperature-dependence of enantioselectivity and desymmetrization in the acetylation of 2-mono- and 2,2-di-substituted 1,3-propanediols by a novel lipase isolated from the yeast *Cryptococcus* spp. S-2. **Biocatalysis and Biotransformation**, vol. 24, n. 5, p. 390-395, 2006a.
- LIN, E-S.; WANG, C-C.; SUNG, S-C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 98-102, 2006b.
- LIU, Y-C.; MARANGONI, A. G.; YADA, R. Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. **Food Research International**, vol. 31, no. 3, p. 243-248, 1998.
- LIU, R.; JIANG, X.; MOU, H.; GUAN, H.; HWANG, H.M.; LI, X. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 46, p. 265–270, 2009.
- LÓPEZ, C.; GUERRA, N. P.; RÚA, M. L. Purification and characterization of two isoforms from *Candida rugosa* lipase B. **Biotechnology Letters**, vol. 22, p. 1291–1294, 2000.
- LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J. L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 93, p. 143–148, 1998.
- LOTTI, M.; BROCCA, S.; PORRO, D. High lipase production by *Candida rugosa* is associated with G1 cells. a flow cytometry study. **Biotechnology Letters**, vol. 23, p. 1803–1808, 2001.
- MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 1729–1735, 2008.
- MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, vol. 53, p. 247–253, 2007.
- MARTINS, E. R. ; CALEFFI, R. ; REZENDE, S.B ; AMADIO J.V.R.S ; LEITE JR.D.P ; HAHN, R. C. . Relato de caso *Candida viswanathii* e *Acinetobacter* spp. no líquido cefalorraquidiano (lcr) em jovem internado no hospital geral universitário (hgu)-cuiabá mt.. in: 25 congresso brasileiro de microbiologia, 2009, Pernambuco. **Microbiologia in foco**. São Paulo : Dolika Afa Artes Gráficas, v. 09. p. 03-132, 2009.

- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, p. 1451–1463, 2007.
- MATEOS DIAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F. Lipase from thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 1042–1050, 2006.
- MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR., A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídios. **Química Nova**, 28 (2), 296–305, 2005.
- MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 45, p. 426–431, 2009.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, vol.100, p. 1486–1490, 2009.
- MOFTAH, O.A.S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied Biochemistry Biotechnology**, vol. 166, p. 348–364, 2012.
- MONTESINOS, J.L.; DALMAU, E.; CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol 78, p.753–761, 2003.
- MURALIDHAR, R. V.; MARCHANT, R.; NIGAM, N. Lipases in racemic resolutions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 76, p. 3–8, 2001.
- MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, vol. 7, p. 57–66, 2002.
- NOBLE, M. E. M.; CLEASBY, A.; JOHNSON, L. N.; EGMONDB, M. R.; FRENKENB, L.G.J. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Letters**, vol. 331, n. 1,2, p. 123–128, 1993.
- OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLA, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, vol. 15, p. 357–360, 1993
- OECD. The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability. Paris, France: OECD; 2001.

- OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H.G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, vol. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.
- PAIVA, A. L.; BALCÃO, V.M.; MALCATA, F.X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 27, 187-204, 2000.
- PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 19–20, p. 279–286, 2002.
- PALOMO, J. M.; PENAS, M. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; PISABARRO, A. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RAMIREZ, L.; GUISÁN, J. M. Solid-phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. **Biomacromolecules**, vol. 4, p. 204-210, 2003.
- PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, vol. 1038, p. 267–273. 2004.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, vol. 35, p. 1153–1169, 2000.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single-cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 10, n. 3, 2007.
- PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARK, D-S.; OH, H-W; HEO, S-Y.; JEONG, W-J.; SHIN, D. H. ; BAE, K. S.; PARK, H-Y. Characterization of an Extracellular Lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 Isolated from a Longicorn Beetle. **The Journal of Microbiology**, vol. 45 , n. 5, p. 409-417, 2007.
- PEREIRA, G. G. Produção, purificação e caracterização bioquímica das lipases produzidas pelos fungos termófilos *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* e *Humicola* sp. **Tese de doutorado**. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP. 224p. 2011.
- PERNAS, M. A.; LÓPEZ, C.; PASTRANA, L. RÚA, M. L. Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. **Journal of Biotechnology**, vol. 84, p. 163–174, 2000.

- PETERS, G.H.; BYWATER, R.P. Influence of a lipid interface on protein dynamics in a fungal lipase. **Biophysical Journal**, vol.81, p. 3052-3065, 2001.
- PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A.; KAMIMURA, E. S. Cutinases fúngicas: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 31, no. 8, p. 2118-2123, 2008.
- PIROZZI, D.; FANELLI, E.; ARONNE, A.; PERNICE, P.; MINGIONE, A. Lipase entrapment in a zirconia matrix: Sol-gel synthesis and catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 59, p. 116-120, 2009.
- PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 37, p. 505-509, 2006.
- PUSKAS, J.; SEO, K. S.; SEN, M. Y. Green polymer chemistry: Precision synthesis of novel multifunctional poly(ethylene glycol)s using enzymatic catalysis. **European Polymer Journal**, vol. 47, 524-534, 2011.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by plackett-burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, vol. 24, n. 3, p. 436-444, 2008.
- RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications-a review. **Bioresource Technology**, vol. 98, p. 2000-2009, 2007.
- RAMANI, K.; CHOCKALINGAM, E.; SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **Journal Indian of Microbiology and Biotechnology**, vol. 37, p. 531-535, 2010.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 6, p. 145-150, 2002.
- REIS, H.; PFIFFI, S.; HAHN, M. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. **Molecular Plant Pathology**, vol 6, n. 3, p. 257-267, 2005.
- RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R. A.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. **Journal of the American Dietetic Association**, vol. 109, n. 4, p. 668 - 679, 2009.
- RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, vol. 43, p. 1132 - 1137, 2010.
- RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, V.; BHAGNÁGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 41, p. 2264-2269, 2006.

- ROMDHANE, I. B-B; FENDRI, A.; GARGOURI, Y.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 53, p. 112–120, 2010.
- RÚA, M. L.; DIAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1156, p. 181-189, 1993.
- RUCHI, G.; GUPTA, G.N.; VAMSIKRISHNAN, M.; KHARE, S.K. Protein coated microcrystals of *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 151, p 160-166, 2008.
- RYU, H. S.; KIM, H. K.; CHOI, W. C.; KIM, M. H.; PARK, S. Y.; HAN, N. S.; OH, T. K.; LEE, J. K. New cold-adapted lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is closely related to filamentous fungal lipases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol 70, p. 321–326, 2006.
- SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; KARIM, M. I. A.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, vol. 58, p. 36– 44, 2012.
- SAMAD, M. Y. A., RAZAK, C. N. A., SALLEH, A. B., YUNUS, W. M. Z. W., AMPON, K. AND BASRI, M. A plate assay for primary screening of lipase activity. **Journal of Microbiology and Methods**, vol. 9, p. 1761–1765, 1989.
- SÁNCHEZ, A.; FERRER, P.; SERRANO, A.; PERNAS, M. A.; VALERO, F.; RÚA, M. L.; CASAS, C.; SOLÀ, C. Characterisation of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, vol. 25, p. 214–223, 1999.
- SANDHU, R. S.; RANDHAWA, H.S. On the re-isolation and taxonomic study of *Candida viswanathii* Viswanathan et Randhawa 1959. **Mycopathologia**, vol. 18, n. 3, p. 179-183, 1962.
- SANDHU, R. S.; RANDHAWA, H.S; GUPTA, I. M. Pathogenicity of *Candida viswanathii* for laboratory animals. A preliminary study. **Sabouraudia**, vol. 4, p. 37-40, 1965.
- SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, G.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 10080–10084, 2011.
- SAKAKI, K.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. Lipase-catalyzed optical resolution of racemic naproxen in biphasic enzyme membrane reactors. **Journal of Membrane Science**, vol. 184, p. 27–38, 2001.
- SARDA, L.; DESNUELLE, P.. Action de la lipase pancréatique sur lês esters en émulsion. **Biochimical and Biophystry Acta**, vol. 30, p. 513–521, 1958.
- SARKAR, S.; SREEKANTH, B.; KANT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B.C. Production and optimization of microbial lipase. **Bioprocess Engineering**, vol. 19 p. 29-32, 1998.

- SATHISH YADAV, K. N.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, G. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 10663–10670, 2011.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 239-247, 2003a.
- SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, vol. 52, p. 1-18, 2003b.
- SCHMIDT, M.; BORNSCHEUER, U.T. High-throughput assays for lipases and esterases. **Biomolecular Engineering**, vol. 22, p. 51-56, 2005.
- SCHMIDT-DANNERT, C.; ARNOLD, F. H. Directed evolution of industrial enzymes. **Tibtech**, vol 17, 135-136, 1999.
- SCHMIDT-DANNERT, C.; PLEISS, J. SCHMID, R.D. A Toolbox of recombinant lipases for industrial applications. **Annals New York academy of Sciences**, vol. 864, no. 1, p.12-22, 1998.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, vol. 19, p. 627–662, 2001.
- SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L. K.; GUPTA, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, vol.37, p. 1075–1084, 2002.
- SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipases: a reiew. **Biotechnology**, vol 10, n. 1., p. 23-40, 2011.
- SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. **Advances Synthical Catalysis**, vol. 349, p. 1289 – 1307, 2007.
- SHELLEY, A. W.; DEETH, H. C.; AND MACRAE, I. C. Review of methods of enumeration, detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to airy applications. **Journal of Microbiology Methods**, vol. 6, p. 123–137, 1987.
- SHOW, P. L.; TANB, C. P.; ANUARA, M. S.; ARIFF, A.; YUSOFA, Y. A.; CHEND, S. K.; LINGE, T. C. Primary recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* strain ST8 and recycling of phase components in an aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 60, p.74– 80, 2012.
- SINCHAIKUL, S.; SOOKKHEO, B.; PHUTRAKUL, S.; PAN, F-M.; CHEN, S-T. Optimization of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: overexpression, purification, and characterization. **Protein Expression and Purification**, vol. 22, p. 388–398, 2001.
- SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 44, p. 13–18, 2009.

- SINGH, R.; GUPTA, N.; GOSWAMI, V.K.; GUPTA, R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol., 70, p. 679–682, 2006.
- SONI, P.; KAUR, G.; CHAKRABORTI, A. K.; BANERJEE, U. C. *Candida viswanathii* as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (S)-*a*-(3-pyridyl)ethanol. **Tetrahedron: Asymmetry**, vol. 16, p. 2425–2428, 2005.
- SONI, P.; KANSAL, H.; BANERJEE, U. C. Purification and characterization of an enantioselective carbonyl reductase from *Candida viswanathii* MTCC 5158. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 1632–1640, 2007a.
- SONI, P.; SINGH, M.; KAMBLE, A. L.; BANERJEE, U. C. Response surface optimization of the critical medium components for carbonyl reductase production by *Candida viswanathii* MTCC 5158. **Bioresource Technology**, vol. 98, p. 829–833, 2007b.
- SRIMHAN, P.; KONGNUM, K.; TAWEERODJANAKARN, S.; HONGPATTARAKERE, T. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 48 p. 293–298, 2010.
- STUER, W.; JAEGER, K. E.; WINKLER, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 1070 - 1074, 1986.
- SUGIMURA, Y.; FUKUNAGA, K.; MATSUNO, T.; NAKAO, K.; GOTOC, M.; NAKASHIO, F. A study on the surface hydrophobicity of lipases. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 5, p. 123–128, 2000.
- SUN, S. Y., XU, Y. Solid-state for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinesis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, vol. 43, p. 219–224, 2008.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 2607–2612, 2009.
- SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **J. Invertebrate Pathology**, vol. 105, p. 228–235, 2010.
- SURRIBAS, A.; STAHN, R.; MONTESINOS, J. L.; ENFORS, S. O.; VALERO, F.; JAHIC, M. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. **Journal of Biotechnology**, vol. 130, p. 291–299, 2007.
- TAHIR, M. N.; ADNAN, A.; MISCHNICK, P. Lipase immobilization on *O*-propargyl and *O*-pentynyl dextrans and its application for the synthesis of click beetle pheromones. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 1276–1283, 2009.
- TAIPA, M. A.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Purification of lipases from *Chromobacterium viscosum*: Is there a high molecular weight lipase? **Biotechnology Techniques**, vol. 6, no. 6, p. 533-538, 1992.

- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1495–1502, 2004.
- TAYYAB, M.; RASHID, N.; AKHTAR, M. Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: cloning and characterization of the lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 111, no. 3, p. 272–278, 2011.
- TENG, Y.; XU, Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 3900–3907, 2008.
- TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 57, p. 292–298, 2009.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess and Technology**, vol. 3, p. 182–196, 2010.
- TRODLER, P.; NIEVELER, J.; RUSNAK, M.; SCHMID, R.D.; PLEISS, J. Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ionexchange chromatography. **Journal Chromatograph**, vol. 1179, p. 161–167, 2008.
- UYANIK, A.; SEN, N.; YILMAZ, M. Improvement of catalytic activity of lipase from *Candida rugosa* via sol-gel encapsulation in the presence of alix(aza)crown. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 4313–4318, 2011.
- VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 9, no.1, 2006.
- VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 13, p. 338–344, 2002.
- VELU, N.; DIVAKAR, K.; NANDHINIDEVI, G.; GAUTAM, P. Lipase from *Aeromonas caviae* AU04: Isolation, purification and protein aggregation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 1, p. 45–50, 2012.
- VENTURA, S. P. M.; SOUSA, S. G.; FREIRE, M. G.; SERAFIMA, L. S.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Design of ionic liquids for lipase purification. **Journal of Chromatography B**, vol. 879, p. 2679–2687, 2011.
- VERGER, R. ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. **Tibtech**, vol. 15, p. 32–38, 1997.
- VISWANATAN, R.; RANDHAWA, H.S. *Candida viswanathii* sp. nova, isolated from a case of meningitis. **Science & Culture**, vol. 25, p. 86–87, 1959.
- VOLPATO, G.; FILICE, M.; AYUB, M. A. Z.; GUISSANA, J. M.; PALOMO, J. M. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. **Journal of Chromatography A**, vol. 1217, p. 473–478, 2010.

- YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous and Mesoporous Materials**, vol. 86, p. 215–222, 2005.
- YAO, H.; ZHANG, T.; XUE, H.; TANG, K.; LI, R. Biomimetic affinity purification of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Chromatography B**, vol. 879, p. 3896–3900, 2011.
- YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 384–391, 2007.
- YU, S.; YU, S.; HAN, W.; WANG, H.; ZHENG, B.; FENG, Y. A novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1 representing a new subfamily of bacterial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 66, p. 81–89, 2010.
- WANG, Y.; WEI, D. Q.; WANG, J. F. Molecular dynamics studies on T1 lipase: insight into a double-flap mechanism. **Journal of Chemical Informatics Model**, vol. 50, p. 875–878, 2010.
- WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 259–264, 2006.
- WILTON, D. C. A continuous fluorescence displacement assay for the measurement of phospholipase A2 and other lipases that release long-chain fatty acids. **Biochemical Journal**, vol. 266, p. 35–439, 1990.
- WILTON, D. C. A continuous fluorescence-displacement assay for triacylglycerol lipase and phospholipase C that also allows the measurement acylglycerols. **Biochemical Journal**, vol. 276, p. 129–133, 1991.
- WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; MAZUTTI, M.; TONIAZZO, G.; RIGO, E.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Response surface methodology for optimization of lipase production by an immobilized newly isolated *Penicillium* sp. **Indian Engineering Chemistry Research**, vol. 47, p. 9651–9657, 2008.
- ZHAO, W., WANG, J., DENG, R., & WANG, X. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 35, p. 189–195, 2008.
- ZHANG, Y-Y.; LIU, J. H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, vol. 878, p. 909–912, 2010.

Capítulo 2

**Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by
a newly isolated *Candida viswanathii* strain**

Abstract

Microorganisms can produce lipases with different biochemical characteristics making necessary the screening of new lipase-producing strains for different industrial applications. In this study, ninety microbial strains were screened as potential lipase producers using a sensitive agar plate method with a suitable medium supplemented with Tween 80 and also a liquid culture supplemented with olive oil. The highest cell growth and lipase production for *C. viswanathii* were found in triolein and oleic acid when used as sole pure carbon sources. Renewable low-cost triacylglycerols supported the best cell growth and olive oil was found to be the best inducer for lipase production (19.50 g/L and 58.50 U). The selected conditions for enzyme production were found with yeast extract as nitrogen source and 1.5% (w/v) olive oil (85.70 U) that resulted in a good cell growth yield ($Y_{x/s} = 1.046$ g/g) and lipase productivity (1.204 U/h) after 72h on shake-flask cultivation. *C. viswanathii* lipase presented high hydrolytic activity on long-chain fatty acids and this strain can be considered an important candidate for future applications in oleochemical industries.

Keywords: *Candida viswanathii*, triacylglycerol, lipase, lipolytic yeast, olive oil

Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases E.C. 3.1.1.3) are hydrolases that catalyze the hydrolysis of triglycerides to glycerol and free fatty acids over an oil-water interface (TREICHEL et al., 2010). The complex lipases mechanism of action includes a process of interfacial activation, which comprises two different conformations: an open and active conformation and a closed and inactive conformation (PALOMO et al., 2005). Due to their ability to hydrolyze fats, lipases are commonly used as additives in industrial laundry and household detergents; however, they can also be applied in the food, pulp and paper, pharmaceutical and chemical industries, and for the resolution of racemic chemicals (SHARMA et al., 2001; HOUDE et al., 2004). More recently this enzyme has been investigated for biodiesel production (LI and YAN, 2010).

Microbial lipases have been receiving special industrial attention because of their biochemical properties and broad substrate specificity. Extracellular yeasts lipases for industrial applications can be produced by submerged and solid state fermentations, and also by immobilized cell cultures (SHARMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010). Many bacteria, yeasts and molds can produce lipases (WANG et al., 2007), and among terrestrial yeasts, several *Candida* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula* spp., *Pichia* spp. and *Trichosporum* spp. are known as lipase producers (VAKHLU and KOUR, 2006; TREICHEL et al., 2010). Molecular biology techniques have also been successfully utilized to increase lipase production by microorganisms (CHANG et al., 2006; DARVISHI et al., 2011; SHENG et al., 2011). Despite the large number of lipase producers, only few yeast strains, such as *Candida* spp., *Torulopsis* spp., *Yarrowia lipolytica*, *Trichosporum* spp., *Geotrichium* sp. and *Pichia* sp. can use hydrophobic substrates (PAPANIKOLAOU and AGGELIS, 2010). The multiplicity and complexity of the genes involved in microorganisms' catabolic pathways significantly valorize hydrophobic substrates like vegetable oils, waste-cooking oil, waste edible oil and tallow allowing the synthesis of high value metabolites such as bio-surfactants, tailor-made single cell-oils, organic acids and biodiesel by these strains (ADAMCZAK et al., 2009; BEOPOULOS et al., 2009; PAPANIKOLAOU and AGGELIS, 2010). *Y. lipolytica* is a model-microorganism capable of breaking-down hydrophobic substrates such as *n*-alkanes, fatty acids, fat and oils through specific metabolic pathways, for the production of single cell protein, single cell oil, organic acids, and lipases (FICKERS et al., 2005; DARVISHI et al., 2009; PAPANIKOLAOU and AGGELIS, 2010).

Currently, research on lipases is focused mainly on the production and biochemical characterization of crude or purified enzymes. An important new approach is the incorporation of carbon (especially hydrophobic substrates) and nitrogen sources, into culture media for a better understanding of the physiology of lipase-producing strains in submerged fermentations and also in order to obtain higher enzyme production (LAKSHMI et al., 1999; DALMAU et al., 2000; FICKERS et al., 2004; TAN et al., 2004; MESSIAS et al., 2009). Some agro-industrial by-products have been evaluated as substrates for the production of fine chemicals and some enzymes, including lipases (PAPANIKOLAOU et al., 2007; DARVISH et al., 2009). In other cases, agro-industrial wastewaters were incorporated in culture media for lipase production, consequently allowing the removal environmental pollutants from contaminated water (VARGAS et al., 2008; MAFAKER et al., 2010). Organic and inorganic nitrogen sources, play an important role in enzymes synthesis as inorganic sources can be used quickly, while organic nitrogen sources can supply cells with growth factors and amino acids required for cell metabolism and enzymes synthesis (TAN et al., 2004). In addition, other parameters such as agitation, pH and temperature should also be considered.

Although some of the above-mentioned lipase producers have been extensively investigated, screening programs have found some emerging lipase-producing yeasts and novel biocatalysts that represents a promise for biotechnological innovation in many areas (BUSSAMARRA et al., 2010). The Brazilian ecosystems biodiversity is a promising source of new microorganisms that can produce a variety of biocatalysts with desirable properties for industrial applications.

The aim of this work was to select the best lipase producing microbial strain isolated from different Brazilian ecosystems or from industrial effluents and also to determine the effect of various carbon and nitrogen sources on the lipase production by the selected strain.

Materials and Methods

Microorganisms: origin and maintenance

Filamentous fungi strains isolated from soil of Atlantic rainforest (RUEGGER and TAUKE-TORNISIELO, 2004) and Caatinga areas (SIMÕES and TAUKE-TORNISIELO, 2006) were obtained from the Culture Collection of the Environmental Studies Center (CEA),

UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil. Yeast strains isolated from Cerrado environment, were provided by the Laboratory of Environmental and Biotechnological Microbiology, Federal University of Tocantins, Palmas, Tocantins, Brazil. Other filamentous fungi strains were isolated from poultry slaughterhouse effluent (Fricock, Rio Claro, São Paulo, Brazil). *Candida viswanathii* was isolated from wastewater of a Brazilian oil refinery (Replan/Petrobras, Paulínia, São Paulo, Brazil) (SOARES Jr. et al., 2008). These strains were considered as from industrial environment. All strains were grown on MEA-slants for five days at 28 °C and subsequently kept in a refrigerator.

Screening of lipolytic microorganisms

Preliminary lipolytic microorganisms screening was carried out in Petri dishes containing the medium proposed by Hankin and Anagnostaki (1975) composed of (g/L): peptone, 10; NaCl, 5; CaCl₂.2H₂O, 0.1, agar, 20, supplemented with 1% (w/v) Tween 20. The final pH was adjusted to 7.4 and the medium was autoclaved at 121 °C, for 20 min. Cultures were incubated at 28 °C and daily examined during 7 days. The enzymatic activity was measured by an enzymatic index, i.e. the rate between the opaque halo diameter around the colony and the diameter of the colony. The best periods of cultivation for measurements was established and colonies showing an opaque area due to calcium salts precipitation were selected for the subsequent screening in liquid medium.

Inoculum preparation and lipase production conditions

Liquid medium was prepared using a modified Vogel's medium (VOGEL, 1956). Trace elements solution (solution A) was prepared containing (g/L): citric acid.H₂O, 50, ZnSO₄.7H₂O, 50, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, 10; CuSO₄.5H₂O, 2.5; MnSO₄.H₂O, 0.05; H₃BO₃, 0.05; Na₂MoO₄.2H₂O, 0,05. Salt solution (solution B) was prepared containing (g/L): sodium citrate.5H₂O, 150; KH₂PO₄, 250; NH₄NO₃, 100; MgSO₄.7H₂O, 10; CaCl₂.2H₂O, 5 and biotin solution (0.1 mg/mL), 5 mL; solution A, 5 mL; 0.2 mL chloroform. The solutions were maintained at 4 °C. Medium preparation consisted in 50-fold dilution of the solution B, replacing glucose by other carbon sources and the final pH was adjusted to 6.0.

Cultures were performed in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 25 mL of culture medium. Soluble pure carbon sources (glucose, galactose, lactose, mannitol, sorbitol, glycerol, citric acid, lactic acid), hydrophobic pure sources (lauric acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, tributyrin and triolein) and natural triacylglycerols (canola, castor, corn, linseed, olive, palm, soybean, sunflower oils, chicken fat, lard and beef tallow) were used initially at 2% (w/v) concentration. Hydrophobic substrates were mechanically emulsified allowing the dispersion of fat particles into the aqueous phase. Nitrogen sources (corn steep liquor, peptone, tryptone, yeast extract, urea, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NH_4NO_3) were added to the culture media at a 0.2% (w/v) concentration. Different concentrations of triacylglycerols (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0%, w/v) were also evaluated with yeast extract or NH_4Cl .

Time-course of lipase production using the best carbon source concentration (olive oil, 1.5% w/v) and nitrogen source (yeast extract) was carried out during 120 h. Samples were collect each 12 h.

All media were autoclaved at 121 °C for 20 min. Inocula were prepared using 5-day old cultures. Media were inoculated with 1 mL yeast cells or fungal suspension (1×10^7 spores or cells per mL) and incubated at 28°C, 180 rpm for the same period of those used in solid cultures. Biomass was separated from the fermentation broth by filtration (membrane cellulose acetate 0,45 μm cut-off) and dried at 105 °C until constant weight. Cell-free broth was used for lipase activity assays.

Lipase activity assays on synthetic substrate

Lipase activity was assayed with *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPP) as substrate (YANG et al., 2002). pNPP was firstly solubilized in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide, then diluted to 50 mM with 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, containing 0.5% Triton X-100. Lipase activity was determined by following the hydrolysis of pNPP at 37°C. The reaction was stopped at different intervals by heat shock (90°C, 1min), followed by the addition of 1 mL saturated sodium tetraborate solution. The *p*-nitrofenolate formed was measured spectrophotometrically at 405 nm. The molar extinction coefficient for *p*-nitrophenol (pNP) at 405 nm is $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Controls were prepared without enzyme. One unit of enzyme

activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of pNP per min. Results were presented as total units of enzymes.

Hydrolytic activity of lipase on triacylglycerols

Hydrolytic lipase activity was determined using a modified titration method (LEAL, 2000). The hydrolysis of tributyrin, triolein or olive oil was determined at 37 °C, following the release of fatty acids by titration. Each 10% substrates (w/v) were individually emulsified in 0.5 mM sodium phosphate buffer pH 7.0, containing 6% (w/v) Triton X-100. The reaction was started by adding 1 mL samples to 5 mL of this emulsion, and then maintained in orbital shaker at 300 rpm for 30 min. The reaction was stopped by adding 16 mL of an acetone:ethanol solution (1:1, v/v). The released fatty acids were titrated to pH 11.0 with a 0.1 M NaOH solution. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of fatty acid per mL per min. The results were expressed as percentage of pNPP hydrolysis.

Determination of residual olive oil after cultivation

The culture supernatant was transferred to Erlenmeyer flasks (125 mL) and acidified to pH 1.0 with concentrated sulfuric acid. Then, 10 mL of hexane were added to the samples, which were vigorously agitated and maintained in a separating funnel until the separation of organic and aqueous phases. The organic phase was oven dried at 40°C and the mass was measured in analytical balance.

Protein analysis

The protein was determined by the Lowry method (LOWRY et al., 1951), using bovine serum albumin as standard.

Results and discussion

Selection of lipolytic microorganisms

Table 1 list the strains evaluated in the selection of lipolytic producers. In the first step, 11 filamentous fungi and 8 yeast strains were selected as lipase-producers in solid medium, representing 21% of the microorganisms (**Table 2**). The *Aspergillus niger*, *Aspergillus* spp. F2, *Lipomyces starkeyi* I and II, *Metharhizium anisopliae*, *Penicillium simplicissimum*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula glutinis* I and II, *Yarrowia lipolytica* I and II, *Rhizopus* sp. L04 and *Candida viswanathii* strains showed the highest enzymatic index reaching over 65%. Lower enzymatic index were observed for *Aspergillus* spp., *Gliocephalotrichum simplex*, *Penicillium verruculosum*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus* sp. L05 and *Verticillium lecani* strains (bellow 56%). These strains were cultured in liquid medium with olive oil and 63% of them presented lipase activity as verified by pNPP hydrolysis (**Table 2**).

No lipase activity was observed in liquid cultures with *P. simplicissimum*, *G. simplex*, *Y. lipolytica* I, *Y. lipolytica* II, *R. graminis*, *L. starkeyi* I and *L. starkeyi* II. These results can be attributed to the medium composition used for lipase production since the *Y. lipolytica* and *P. simplicissimum* are known good lipase producers in submerged and solid state cultivations (GUTARRA et al., 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2007; WANG et al., 2007; VARGAS et al., 2008; SHENG et al., 2011). *Aspergillus* spp., *Aspergillus* spp. F2, *A. niger*, *P. janthinellum*, *P. verruculosum*, *R. glutinis* I, *R. glutinis* II, *V. lecani*, *Rhizopus* sp. L04 and L05 strains produced only low levels of lipase activity. The greatest lipase activity was verified with *C. viswanathii* that presented values of 52.50 U, significantly higher than that from *M. anisopliae* (23.75 U). *C. viswanathii* is reported here for the first time as an extracellular lipase producer and no information about the lipase produced and its properties are known to date. A biotechnological application of *C. viswanathii* lipase is for the production of carbonil reductase, which presents high enantioselectivity and high potential for hydrocarbons and biodiesel degradation (SOARES JR et al., 2008; FATIMA et al., 2007). Therefore, due to its biotechnological potential as well as due to the high lipase production, *C. viswanathii* was selected for further optimization studies.

Effect of pure carbon sources

C. viswanathii can use various carbon compounds for energy production and biomass formation (KURTZMAN et al., 2011). When cultivated in medium supplemented with glucose, galactose, mannitol, sorbitol or glycerol *C. viswanathii* growth is verified but no lipase production was observed (**Table 3**). These results suggest this enzyme is inducible and can be subjected to catabolic repression, as observed for the lipase production by *Candida rugosa* (DALMAU et al., 2000). Cultures with lactose, lactic acid and citric acid showed low cell growth (1.20, 1.52 and 2.33 g/L, respectively) and no lipase production. Among the fatty acids and triacylglycerols, the highest *C. viswanathii* growth was observed with oleic acid and triolein. *C. viswanathii* growth on hydrophobic substrates was critically influenced by composition of the fatty acids in the medium. Cultivation with saturated fatty acids (lauric, myristic, palmitic, stearic) provided low growth (values between 2.00 and 4.56 g/L, respectively), and low lipase production (0.25U). One possible reason is that all these fatty acids are solids, and cannot be dispersed completely in the broth. Similar results were also observed for the lipase production by *Rhizopus chinensis* (TENG et al., 2009), and a possible solution for this problem would be the addition of emulsifiers or ethanol into the culture medium (SHIMADA et al., 1992). The highest *C. viswanathii* growth and lipase production were observed with triolein (10.82 g/L and 10.25 U, respectively), followed by acid oleic acid (9.06 g/L and 6.75 U, respectively) and the highest specific activities were also observed with this triacylglycerol and fatty acid (3.43 U/mg and 2.88 U/mg, respectively). Usually, saturated fatty acids supported microbial growth and lipase production by yeasts as observed in several other studies (OBRADORS et al., 1993; DALMAU et al., 2000; SARAVANAN et al., 2007), however, oleic acid has been considered the most important inducer for some microorganisms (SHARMA et al., 2001; TREICHEL et al., 2010).

Microbial growth in cultures performed without carbon sources (control) and/or with tributyrin showed that the *C. viswanathii* strain could not use this carbon source for growth or for lipase production; however, the yeast could have produced some isozymes or an esterase responsible for the hydrolysis of this triacylglycerol and cell maintenance. Differently from other hydrophobic substrates, e.g. alkanes, triacylglycerols are firstly hydrolysed by lipolytic enzymes into free fatty acids, which are then taken up directly into the cell (FICKERS et al., 2005), and tributyrin, followed of other short- and medium-chain fatty acids, was found to be a potent repressor of lipase production in *Acinetobacter calcoaceticus* (KOK et al., 1996).

C. viswanathii growth was absent in medium with linoleic acid. This pure unsaturated fatty acid can have caused the death of the inoculum, since this fatty acid may cause apoptosis in yeast cells even at low concentrations (FERREIRA et al., 2011). Although, other reports indicate that linoleic acid is not toxic to yeast cells, and lipases can be produced with this carbon source by filamentous fungi (SHIMADA et al., 1992; OHNISHI et al., 1994; POGORI et al., 2008; TENG et al., 2009). Thus, Ferreira et al. (2011) demonstrated with *Saccharomyces cerevisiae* that cell growth decreased in cultures treated with 0.1 mM linoleic acid, and the toxicity was dependent of the number of cells used in the experiment. This finding could explain the results found in this study since this fatty acid was present at high concentration in the culture medium.

Effects of natural triacylglycerols

Lipase production and *C. viswanathii* growth in different natural triacylglycerols, as well as predominant fatty acids presence are shown in **Table 4**. The choice of inducers was based on the presence of high percentage of long chain fatty acids, its availability and cost. The cultures prepared with natural triacylglycerols were more effective for lipase production and cell growth in comparison with pure fatty acids (**Table 3**). These findings would be related to the intrinsic composition of the vegetable oils, and also to the presence of several tocopherols and other liposoluble vitamins that are important for microbial growth.

The highest lipase activity (58.50 U) and cell growth (19.50 g/L) were achieved in medium with olive oil. The lowest lipase activity was detected, respectively, in castor oil, beef tallow and lard. The results found for lipase production with castor oil could be related to the anti-nutritional effect of the ricinoleic acid (present in 90% of total composition), an unsaturated omega-9 fatty acid that has in its structure an unusual hydroxyl linked to the 12-carbon. Besides this fatty acid, castor oil is composed by 0.7% palmitic acid, 0.9% stearic acid, 2.8% oleic acid, 4.4% linoleic acid and 0.2% linolenic acid (SALIMON et al., 2010). These results were also found for the lipase produced by *C. rugosa* with coconut oil that present the hydroxy substituted C-14 fatty acids (LAKSHMI et al. 1999). Moreover, beef tallow and lard are solid in ambient temperature and mechanical emulsion could not promote adequate dispersion of these substrates in the liquid medium, resulting in low lipase production, and low biomass formation.

Parameters analyzed for olive oil including $Y_{X/S}$ (0.975 g/g), P_X (0.270 g/h), $Y_{L/S}$ (2.808 U/g), P_L (0.812 U/h) and q_L (0.041 U/g/h), indicate that this carbon source is a suitable hydrophobic substrate for lipase production. The highest specific activity was also found in cultures with olive oil (10.63 U/mg of protein), followed by palm oil (10.54 U/mg of protein). These results could be justified by the fact that *C. viswanathii* lipase was induced preferentially with esters of monounsaturated (18:1 Δ^9) fatty acids followed of this fatty acid, as showed in **Table 3**. Olive oil is constituted by triacylglycerols that contains approximately 80% oleic acid and it is considered a good inducer for lipase synthesis by many microorganisms (SHARMA et al., 2001; DARVISH et al., 2009; WANG et al., 2007; MAFAKHER et al., 2010), what could be related with the fact of the lipases hydrolyze ester bounds preferentially of fatty acids residues at positions 1 and 3 of the glycerides, and some extracellular lipase requires oleic acid as stabilizer/activator (BARTH and GAILLARDIN, 1997).

Other triacylglycerols sources, i.e. maize, soybean, canola, linseed, sunflower, palm oils and chicken fat, promoted cell growth but were not efficient to induce the secretion of high levels of lipase into the fermentation medium. Combinatory effect of olive and palm oil (0.75:0.25) was effective for lipase production (42.75 U) and biomass formation (18.36 g/L) by *C. viswanathii*. Yield parameters analyzed for this combined carbon source presented good growth ($Y_{X/S} = 0.918$ g/g) and lipase production ($Y_{L/S} = 2.137$ U/g, $P_L = 0.593$ U/h and $q_L = 0.032$ U/g/h), it would be important to turn the process more cost effective.

The incorporation of vegetable oil with different predominant C18:n fatty acids could have influenced the lipase production and cell growth in flasks fermentation due to enzyme specificity for some fatty acids. The results in **Figure 1** indicated *C. viswanathii* lipase shows the highest hydrolytic activity on triolein and olive oil suggesting this enzyme preferentially hydrolyzes long chain fatty acids. A correlation among lipase activity and predominant C18:n fatty acids was verified for the *C. rugosa* lipase in which it was observed that lipase production increased as the total amount of C18:n fatty acids esters in the vegetables oils increased (LAKSHMI et al. 1999). In this study, the composition of unsaturated C18:1 fatty acids of the vegetable oils clearly enhanced the lipase production of *C. viswanathii*. This finding was also reported for the lipase production by many microorganisms because oleic acid is not the best carbon source for lipase production but it is an easily assimilable carbon source (LAKSHMI et al., 1999; AZEREDO et al., 2007; TENG et al., 2009).

Effect of nitrogen sources

Various mineral and organic nitrogen sources were evaluated in the lipase production and *C. viswanathii* growth and the results are shown in the **Table 5**. Among mineral nitrogen sources, ammonium chloride and ammonium sulfate supported good cell growth (14.06 g/L and 14.56 g/L, respectively) but a deleterious effect on lipase production was observed. Moreover, ammonium nitrate supported good cell growth (19.5 g/L), lipase production (58.50 U) and also resulted in high specific activity (10.63 U/mg of protein).

Organic nitrogen sources (peptone, tryptone and yeast extract) lightly increased lipase and cell productivity, except for corn steep liquor. Yeast extract was the best nitrogen source for lipase production (68.75 U) and cell growth (24.37 g/L). The highest specific activity (10.57 U/mg) was also observed with this nitrogen source. For other parameters analyzed, *C. viswanathii* presented high cell growth and lipase production with peptone ($Y_{X/S} = 1.049$ g/g; $Y_{L/S} = 2.962$ U/g), tryptone ($Y_{X/S} = 1.042$ g/g; $Y_{L/S} = 3.100$ U/g) and yeast extract ($Y_{X/S} = 1.218$ g/g; $Y_{L/S} = 0.340$ U/g). These organic nitrogen sources are usually used as they provide additional nutritional factors such as amino acids, vitamins and cofactors to the cells (BARTH and GAILLARDIN, 1997; TAN et al., 2004; DARVISH et al., 2009).

The high specific rate of lipase production (0.072 U/g/h) and biomass production ($Y_{X/S} = 0.539$) with corn steep liquor indicates that this low-cost nitrogen source could be a strong candidate for lipase production in large scale process, since in the literature it is suggested that lower $Y_{X/S}$ values around 0.5 - 0.7 g/g obtained from high-lipase producing are very satisfactory for single-cell protein fermentation with fatty substrates (KAMZOLOVA et al., 2005; PAPANIKOLAOU et al., 2007; DARVISH et al., 2009). Urea provided the lowest growth (3.80 g/L) and lipase production (0.50 U). Although this nitrogen source was used for lipase production in other studies (CORZO and REVAH, 1999; RODRIGUEZ et al., 2006), during the test of assimilation the *C. viswanathii* strain weakly used urea for growth.

Effect of selected inducer concentrations

As discussed above, nitrogen sources may supply microorganisms with different requirements during the growth and enzyme production. Thus, the effects of ammonium nitrate and yeast extract on lipase production and *C. viswanathii* growth were evaluated using

several concentrations of olive oil in the fermentation medium. These nitrogen sources were chosen for these experiments because they presented very similar specific activity values (~10 U/g of protein) and they are readily available at low cost.

The maximal lipase production (86.50 U) and the highest specific activity (12.8 U/mg of protein) were achieved in cultures supplemented with 1.5% (w/v) olive oil (86.50 U) and yeast extract (**Table 6**). The highest lipase production (64.50 U) was in 3.0% (w/v) olive oil cultures supplemented with ammonium nitrate. Above these concentrations lipase activity decreased due to the inhibitory effect of the produced glycerol (LAKSHMI et al., 1999). In similar studies, maximal lipase production was achieved in cultures with 0.75 – 2.5% (w/v) vegetable oils (MAHADIK et al., 2002; TAN et al., 2004; GULATI et al., 2005).

C. viswanathii cultures with olive oil (at 0.5 – 1.5%, w/v) rendered excellent biomass yield ($Y_{X/S} > 1.2$ g/g) when supplemented with yeast extract. Above this olive oil concentration it was observed a continuous decrease in biomass yield. Cell growth with ammonium nitrate was lower when compared to cultures with yeast extract; however, these results are interesting in the case of a strain that shows good growth on hydrophobic substrates. This growth behavior on hydrophobic substrates is commonly found in oleaginous microorganisms that are capable to consume fats and at the same time accumulate high quantities of intracellular lipids (PAPANIKOLAOU and AGGELIS, 2011). *Y. lipolytica* cultures in olive oil supplemented with ammonium sulfate presented 0.710 g/g biomass yield (DARVISH et al., 2009), that is considered a good single-cell growth on hydrophobic substrates.

Time-course of lipase production

The time-course of lipase production and olive oil consumption were assayed for 120 h in medium with 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract. The highest enzyme production and specific activity values were observed in 72 h cultures (85.70 U, 14.31 U/mg of protein, respectively) (**Figure 2a**). Typical microbial growth and olive oil consumption curves were observed (**Figure 2b**). After 24 h, the olive oil was exhausted from the fermentation medium and after 60 h, growth reached the stationary phase with maximal cell growth achieved after 48 h cultivation (16.00 g/L). Lipase production was cell growth associated, and lipase production decreased from middle of stationary phase. These results are

similar to those with *Rhizopus arrhizius* and *C. rugosa* in relation to cell growth and lipase production (ELIBOL and OZER, 2000; TAKAÇ et al., 2010).

The data of this study are also compared in terms of maximum extracellular productivity (Table 6). Therefore, these results found for biomass and lipase yield ($Y_{X/S} = 1.245$ g/g; $Y_{L/S} = 6.117$ U/g), productivity ($P_X = 0.242$ g/h; $P_L = 1.204$ U/h) and specific rate of lipase production ($q_L = 0.066$ U/g.h) were considered very satisfactory for biomass and single-cell protein production.

Concluding remarks

C. viswanathii was selected as lipase-producer among ninety candidates for lipase production. The lipase production in media with pure hydrophobic substrates indicated that this enzyme is meaningfully induced by triolein and oleic acid. Renewable low-cost substrates, e.g. vegetable oils as olive oil, were more effective for lipase production and could support expressive cell growth. Due to these characteristics, *C. viswanathii* strain can be an important candidate for hydrophobic substrates degradation and lipid accumulation. Our results suggest that a more detailed study should be carried out to improve the lipase production and to investigate the potential of this strain for lipid accumulation.

The high hydrolytic activity of *C. viswanathii* lipase on olive oil and triolein is important for a future application of this enzyme in order to obtain unsaturated fatty acids. Due to its biotechnological importance, further studies are underway aiming to optimize the production of lipase and also to purify and biochemically characterize this enzyme. This way, we expect a better exploitation of the potential of this microorganism and of the lipase produced.

Abbreviations

X: biomass (g/L);

L: maximum lipase activity (U);

S: substrate (g/L);

Y_{X/S_0} : biomass yield on substrate unconsumed (g/g);

$Y_{L/S0}$: lipase yield on substrate unconsumed (U/g);
 $Y_{X/S}$: biomass yield on substrate consumed (g/g);
 $Y_{L/S}$: lipase yield on substrate consumed (U/g);
 P_X : biomass productivity (g/h);
 P_L : lipase productivity (U/h);
 q_L : specific rate of lipase production (U/g of biomass/h)

Acknowledgments

The authors would like to thank the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) for the financial support and for the scholarship awarded to the first author. Dr. Paula Benevides de Moraes for providing the yeasts of Cerrado environmental, Dr. Dejanira de Franceschi de Angelis for providing the *Candida viswanathii* strain for this study and Dr. César F. Terrasan his suggestions on the manuscript.

References

- ADAMCZAK, M.; BORNSCHEUER, U.T.; BEDNARSKI, W. The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. **European Journal Lipid Sciences Technolology**, vol. 111, p. 808–813, 2009.
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA JR.; G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. **Current Microbiology**, vol. 54, p. 361-365, 2007.
- BARTH, G.; GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. **FEMS Microbiology Reviews**, vol. 19, p. 19-237, 1997.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; NICAUD, J.M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. **Progress in Lipid Research**, vol. 48, p. 357-387, 2009.
- BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 268–275, 2010.

- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, vol. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.
- CHANG, S.W.; SHIEH, C.J.; LEE, G.C.; AKOH, C. C.; SHAW, J. F. Optimized growth kinetics of *Pichia pastoris* and recombinant *Candida rugosa* LIP1 production by RSM. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, vol. 11, no. 1-2, p. 28-40, 2006.
- CORZO, G.; REVAH, S. Production and characterization of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, vol. 70, p. 173-180, 1999.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme Microbial and Technology**, vol. 26, p. 657-663, 2000.
- DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Effect of plant oils upon lipase and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2009. doi:10.1155/2009/562943
- DARVISHI, F.; DESTAIN. J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleate. **New Biotechnology**, vol. 28, p. 756:760, 2011.
- EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S. Corn steep liquor as a nutrition adjunct for the production of *Aspergillus niger* lipase and hydrolysis of oils. **Thereof Journal Agricultural Food Chemistry**, vol. 57, p.10658–10663, 2009.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, vol. 36 p. 325-329, 2000.
- FATIMA, Y.; KANSAL, H.; SONI, P.; BANERJEE, U. C. Enantioselective reduction of aryl ketones using immobilized cells of *Candida viswanathii*. **Process Biochemistry**, vol.42, p. 1412–1418, 2007.
- FERREIRA, T.C.; MORAES, L. M. P.; CAMPOS, E. G. Cell density-dependent linoleic acid toxicity to *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, vol. 11, p. 408–417, 2011.
- FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, p. 742–749, 2004.
- FICKERS, P.; DESTAIN, J.; THORNART, P. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Research**, vol. 5, p. 527–543, 2005.
- GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure Applied Chemistry**, vol. 77, n. 1, p. 251–262, 2005.
- GUTARRA, M. L. E.; MATEUS, G. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a

- residue from Babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 82, p. 313-318, 2007.
- HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS, S. G. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycology**, v. 67, p. 597-607, 1975.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. **Annals of Microbiology**, vol. 56, p. 247-252, 2006.
- HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, p. 175-186, 2004.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 118, p. 155-170, 2004.
- KALO, P.; KEMPPINEM, A. Triglycerides/Structures and Properties. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Elsevier 5857-5868, 2003.
- KAMZOLOVA, S.V.; MORGUNOV, I.G.; AURICH, A. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 43, p. 113-122, 2005.
- KOK, R. G.; NUDEL, C.B.; GONZALEZ, R. H.; NUGTEREN-ROODZANT, I. M.; HELLINGWERF, K. J. Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: fatty acid repression of *lipa* expression and degradation of LipA. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 6025–6035, 1996.
- KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Elsevier, San Diego, 2011.
- LAKSHMI, B. B.; KANGUEANE, P.; ABRAHAM, B.; PENNATHUR, G. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). **Letters in Applied Microbiology**, vol 29, p. 66-70, 1999.
- LEAL, M. C. M. R. Utilização de enzimas hidrolíticas no tratamento de resíduos da indústria de laticínios. **Dissertação**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.
- LI, Q.; ZHENG, J.; YAN, Y. Biodiesel preparation catalyzed by compound-lipase in co-solvent. **Fuel Process Technology**, vol. 91, p. 1229–1234, 2010.
- LI, Q.; YAN, Y. Production of biodiesel catalysed by immobilization *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. **Applied Energy**, vol. 87, p. 3148-3154, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, p. 265-275, 1951.
- MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New Biotechnology**, vol. 27, p. 337-341, 2010.

- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 715 - 721, 2002.
- MESSIAS, J. M., COSTA, B. Z.; LIMA, V. M. G.; DEKKER R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 45, p. 426–431, 2009.
- OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLA, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, vol. 15, p. 357–360, 1993
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 77, no. 5, p. 490 – 495, 1994.
- PALOMO JM, ORTIZ C, FERNÁNDEZ-LORENTE G, FUENTE M; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme Microboly and Technology**, vol. 36, p. 447-454, 2005.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTU, M.; KOMATIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 10, no. 3, 2007.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G.. *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. **European Journal Lipid Science Technology**, vol. 112, p. 639–654, 2010.
- PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G.. Lipids of oleaginous yeasts. Part I: Biochemistry of single cell oil production. **European Journal Lipid Science Technology**, vol. 113, p.1031–1051, 2011.
- POGORI, N.; AHMAD, C.; YAN, X.; DONG, W. Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021. **Biotechnology**, vol. 7, p. 710 – 717, 2008.
- RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZALEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 41, p. 2264 – 2269, 2006.
- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. **Revista Brasil Botânica**, vol. 27, p. 205-211, 2004.
- SALIMON, J.; NOOR, D. A. M.; NAZRIZAWATI, A. T. Fatty composition and physiological properties of Malaysian castor been *Ricinus communis* L. seed oil. **Sains Malaysians**, vol. 39, p. 761-764, 2010.

- SARAVANAN, A. N.; SUCHITRA, N.; DHANDAYUTHAPANI, K. Role of saturated fatty acids in lipase production using *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Food Biochemistry**, vol. 31, p. 748-756, 2007.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, vol. 19, p. 627-662, 2001.
- SHENG, J.; WANG, F.; WANG, H. Y.; SUN, M. Cloning, characterization and expression of a novel lipase gene from marine psychrotrophic *Yarrowia lipolytica*. **Annals Microbiology**. 2011.
- SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol 74, no. 2, p. 77-80, 1992.
- SIMÕES, M. L. G.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automático no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de área de caatinga. **Holos Environment**, vol. 5, no. 2, p. 94-103, 2006.
- SOARES JR, J.; MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journl of Biotechnology**, vol. 8, p. 2774-2778, 2008.
- TAKAÇ, S.; UNLU, A. E.; ERDEN, B. Oxygen transfer strategy modulates the production of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. **Journal Molecular Catalysis B-Enzyme**, vol. 64, p. 150-54, 2010.
- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 1495-1502, 2004.
- TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentations by lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 57, p. 292-298, 2009.
- THOMSON, C. A.; DELAQUIS, P. J.; MAZZA, A. G. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. **Critical Review Food Science Nuture**, vol. 39, p. 165-187, 1999.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess and Technology**, vol. 3, p. 182-196, 2010.
- VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 9, no.1, 2006.
- VARGAS, G. D. L.P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 83, p. 47-54, 2008.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, L.; CHI, Z.; WANG, X.; LIU, Z.; LI, J. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. **Annals Microbiology**, 57, p. 495-501, 2007.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, vol. 15, p. 147-152, 2002.

Table 1. Total microorganisms selected for screening of lipase producers.

	Strains	
	Filamentous fungi	Yeasts
Atlantic rainforest	33	-
Caatinga area	34	-
Cerrado environment	-	7
Industrial environment	9	7

Table 2. Evaluation of lipase production from selected filamentous fungi and yeasts.

Strain	Origin	Time of	Solid cultures	Liquid cultures
		cultivation (h)*	Enzimatic index (%)	Lipase activity (U)
<i>Penicillium simplicissimum</i>		120	74.96 ± 4.11	ND
<i>Penicillium verruculosum</i>		120	40.42 ± 4.38	0.75 ± 0.01
<i>Penicillium janthinellum</i>		120	38.64 ± 6.86	9.50 ± 0.12
<i>Verticillium lecani</i>	Atlantic rainforest	120	26.76 ± 1.09	0.75 ± 0.02
<i>Metarhizium anisopliae</i>		120	70.10 ± 0.46	23.75 ± 2.25
<i>Gliocephalotrichum simplex</i>		120	55.78 ± 6.14	ND
<i>Aspergillus</i> spp.		120	48.60 ± 1.61	6.44 ± 0.83
<i>Aspergillus niger</i>	Caatinga	120	80.53 ± 2.08	7.50 ± 0.81
<i>Yarrowia lipolytica</i> I		72	70.58 ± 4.88	ND
<i>Y. lipolytica</i> II		72	68.24 ± 2.90	ND
<i>Rhodotorula graminis</i>		72	79.24 ± 2.97	ND
<i>Rhodotorula glutinis</i> I	Cerrado	72	74.51 ± 1.52	2.25 ± 0.75
<i>R. glutinis</i> II		72	72.24 ± 1.83	2.76 ± 0.50
<i>Lipomyces starkeyi</i> I		72	77.76 ± 4.69	ND
<i>Lipomyces starkeyi</i> II		72	73.30 ± 5.92	ND
<i>Rhizopus</i> sp. L04		120	68.48 ± 8.05	0.75 ± 0.00
<i>Rhizopus</i> sp. L05	Industrial environment	120	26.40 ± 0.01	0.25 ± 0.01
<i>Aspergillus</i> spp. F2		120	71.33 ± 2.84	1.25 ± 0.09
<i>Candida. viswanathii</i>		72	66.67 ± 2.15	52.50 ± 5.50

* Time (h) represent the maximum lipolytic activity observed in agar plates cultures containing Tween 80. Liquid cultures were performed in liquid Vogel's medium with 2% (w/v) olive oil, 180 rpm at 28°C.

Table 3. Lipase production and *Candida viswanathii* growth in different pure carbon sources.

Carbon sources	Lipase activity (U)	Specific activity (U/mg)	Biomass (g/L)
<i>Carbohydrates</i>			
Glucose	ND	ND	11.85 ± 0.07
Galactose	ND	ND	9.32 ± 0.68
Lactose	ND	ND	1.20±0.01
<i>Alcools</i>			
Mannitol	ND	ND	13.63 ± 0.99
Sorbitol	ND	ND	8.83 ± 0.52
Glycerol	ND	ND	15.47 ± 0.35
<i>Organic acid</i>			
Citric acid	ND	ND	2.33 ± 0.35
Lactic acid	ND	ND	1.52 ± 0.39
<i>Fatty acids</i>			
Lauric (12:0)	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.02	4.56 ± 0.45
Mirystic (14:0)	0.25 ± 0.01	0.15 ± 0.01	3.25 ± 0.04
Palmitic (16:0)	0.25 ± 0.01	0.12 ± 0.00	3.32 ± 0.51
Stearic (18:0)	0.25 ± 0.01	0.04 ± 0.00	2.06 ± 0.03
Oleic (18:1)	6.75 ± 0.75	2.88 ± 0.71	9.06 ± 0.11
Linoleic (18:2)	ND	ND	ND
<i>Triacylglycerols</i>			
Tributyryl	ND	ND	2.88 ± 0.05
Triolein	10.25 ± 0.98	3.43 ± 0.90	10.82 ± 0.08

Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium with 2% (w/v) carbon sources, pH 6.0, 72 h, 180 rpm at 28°C. ND: not detected.

Table 4. Lipase production and *Candida viswanathii* growth in different natural mixtures of triacylglycerols.

Natural triacylglycerols	Predominant fatty acids*	X	L	Specific activity (U/mg prot.)	$Y_{x/s0}$	P_x	$Y_{L/s0}$	P_L	q_L
Castor oil	18:1 ω -OH (90%)	6.55 ± 0.13	0.75 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.372	0.091	0.037	0.010	0.001
Olive oil	18:1 (76-79%)	19.50 ± 3.25	58.50 ± 5.25	10.63 ± 0.66	0.975	0.270	2.808	0.812	0.041
Soybean oil	18:2 (54%), 18:1 (25%)	13.90 ± 2.04	14.64 ± 1.50	6.77 ± 0.72	0.695	0.193	0.732	0.203	0.014
Canola oil	18:1 (61%), 18:2 (21%)	10.46 ± 1.47	16.33 ± 1.32	8.88 ± 0.50	0.523	0.145	0.816	0.226	0.021
Maize oil	18:2 (57%), 18:1 (28%)	16.94 ± 1.42	11.28 ± 1.62	3.91 ± 0.48	0.847	0.235	0.564	0.156	0.009
Sunflower oil	18:2 (66%), 18:1 (22%)	16.13 ± 0.18	25.99 ± 1.75	7.53 ± 0.89	0.806	0.224	1.299	0.360	0.022
Palm oil	16:0 (48%), 18:1 (36%)	12.30 ± 0.27	29.00 ± 2.12	10.54 ± 0.98	0.615	0.170	1.450	0.402	0.032
Linseed oil	18:3 (53%), 18:1; 18:2 (~20%)	18.95 ± 1.02	21.50 ± 1.03	7.16 ± 0.28	0.947	0.263	1.075	0.298	0.015
Chicken fat	18:1 (55%), 16:0; 18:2 (18%)	14.71 ± 0.31	19.25 ± 1.00	6.41 ± 0.99	0.735	0.204	0.962	0.267	0.018
Lard	18:1 (44%), 16:0 (29%)	4.33 ± 0.07	2.75 ± 1.25	1.22 ± 0.12	0.216	0.060	0.137	0.038	0.008
Beef tallow	18:1 (35%), 18:0 (26%), 16:0 (30%)	5.46 ± 0.95	2.50 ± 0.09	0.10 ± 0.02	0.273	0.075	0.125	0.034	0.006
P+O (1:1)	-	18.36 ± 3.09	42.75 ± 4.00	9.00 ± 0.85	0.918	0.255	2.137	0.593	0.032
P+O (0.75:0.25)	-	19.28 ± 0.82	26.75 ± 1.75	5.94 ± 0.42	0.964	0.267	1.337	0.371	0.019
P+O (0.25:0.75)	-	16.39 ± 3.27	36.75 ± 3.07	7.73 ± 0.96	0.819	0.227	1.837	0.510	0.031

Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium with 2% (w/v) vegetable oils or animal fats, pH 6.0, 72 h, 180 rpm at 28°C.

* Salimon et al. (2010); Kalo and Kempinim (2003)

Legend: P+O, palm oil and olive oil mixtures; X, biomass; L, lipase; $Y_{x/s0}$, biomass yield on initial substrate (g/g); $Y_{L/s0}$, lipase yield on initial substrate; P_x , biomass productivity (g/h); P_L , lipase productivity (U/h); q_L , specific rate of lipase production (U/g biomass/h)

Table 5. Lipase production and *Candida viswanathii* growth with different nitrogen sources.

Nitrogen sources (0.2 %, w/v)	X	L	Specific activity (U/mg prot.)	$Y_{x/s0}$	P_x	$Y_{L/s0}$	P_L	q_L
NH ₄ NO ₃ (control)	19.50 ± 3.25	58.50 ± 0.33	10.63 ± 0.66	0.975	0.270	2.925	0.812	0.041
Peptone	20.98 ± 3.05	59.25 ± 0.39	3.76 ± 0.62	1.049	0.291	2.962	0.822	0.039
Tryptone	20.84 ± 4.44	62.00 ± 0.35	4.73 ± 0.98	1.042	0.289	3.100	0.861	0.041
Yeast extract	24.37 ± 1.25	68.75 ± 0.25	10.57 ± 0.86	1.218	0.340	3.437	0.954	0.039
Cor steep liquor	10.79 ± 0.55	55.75 ± 0.34	8.25 ± 0.18	0.539	0.149	2.787	0.774	0.072
Urea	3.80 ± 0.89	0.50 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.190	0.052	0.025	0.006	0.001
NH ₄ Cl	14.06 ± 0.67	2.00 ± 0.00	0.24 ± 0.00	0.703	0.195	0.100	0.030	0.001
(NH ₄) ₂ SO ₄	14.56 ± 1.08	4.25 ± 0.01	0.54 ± 0.04	0.728	0.202	0.212	0.060	0.004

Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium with 2% (w/v) olive oil, pH 6.0, 72 h, 180 rpm, at 28°C.

Legend: X, biomass; L, lipase; $Y_{x/s0}$, biomass yield on initial substrate (g/g); $Y_{L/s0}$, lipase yield on initial substrate; P_x , biomass productivity (g/h); P_L , lipase productivity (U/h); q_L , specific rate of lipase production (U/g biomass/h)

Table 6. Effect of olive oil concentrations in lipase production by *C. viswanathii* in medium with ammonium nitrate or yeast extract.

Olive oil concentration (% w/w)	X	L	Specific activity (U/mg prot.)	$Y_{x/s0}$	P_x	$Y_{L/s0}$	P_L	q_L
Ammonium nitrate (0.2%, w/w)								
0.5	8.56 ± 0.23	21.25 ± 3.42	5.08 ± 0.49	1.712	0.118	4.25	0.295	0.034
1.0	12.10 ± 0.16	46.50 ± 7.20	9.01 ± 0.93	1.210	0.168	4.65	0.645	0.053
1.5	14.66 ± 0.24	55.75 ± 5.77	10.27 ± 0.57	0.977	0.203	5.575	0.774	0.052
2.0	15.95 ± 0.31	58.50 ± 6.42	10.46 ± 0.66	0.797	0.221	2.925	0.812	0.050
2.5	19.47 ± 0.63	59.75 ± 6.67	10.54 ± 0.68	0.778	0.270	2.390	0.829	0.042
3.0	19.82 ± 1.97	64.50 ± 7.15	10.58 ± 1.02	0.660	0.275	2.150	0.895	0.045
3.5	19.18 ± 0.97	58.00 ± 8.20	8.35 ± 0.76	0.548	0.266	1.657	0.805	0.041
Yeast extract (0.2%, w/w)								
0.5	7.95 ± 0.52	58.25 ± 3.65	8.50 ± 0.53	1.590	0.110	11.65	0.809	0.101
1.0	13.12 ± 0.36	78.75 ± 7.72	11.00 ± 0.75	1.312	0.182	7.875	1.093	0.083
1.5	18.44 ± 0.11	86.50 ± 9.62	12.79 ± 0.19	1.229	0.256	5.766	1.201	0.065
2.0	20.58 ± 0.79	68.75 ± 1.40	10.63 ± 0.77	1.029	0.285	3.437	0.954	0.046
2.5	22.04 ± 0.22	66.00 ± 5.67	8.91 ± 0.79	0.889	0.306	2.640	0.916	0.041
3.0	24.05 ± 0.92	66.25 ± 5.70	8.88 ± 0.73	0.801	0.334	2.208	0.920	0.038
3.5	26.35 ± 0.93	65.00 ± 5.35	8.5 ± 0.31	0.752	0.365	1.857	0.902	0.034

Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium, 0.2 (w/v) nitrogen source, pH 6.0, 72 h, 180 rpm at 28°C.

Legend: X, biomass; L, lipase; $Y_{x/s0}$, biomass yield on initial substrate (g/g); $Y_{L/s0}$, lipase yield on initial substrate; P_x , biomass productivity (g/h); P_L , lipase productivity (U/h); q_L , specific rate of lipase production (U/g biomass/h)

Table 7. Parameters of the fermentation for lipase production by *C. viswanathii* using 1.5% (w/v) olive oil, 0.2% (w/v) yeast extract, 180 rpm and at 28 °C.

Time-fermentation	X	L	Specific activity (U/mg prot.)	$Y_{x/s}$	P_x	$Y_{L/s}$	P_L	q_L
72 hours	17.45	85.70	14.31	1.245	0.242	6.117	1.204	0.066

Legend: X, biomass; L, lipase; $Y_{x/s}$, biomass yield on initial substrate (g/g); $Y_{L/s}$, lipase yield on initial substrate; P_x , biomass productivity (g/h); P_L , lipase productivity (U/h); q_L , specific rate of lipase production (U/g biomass/h)

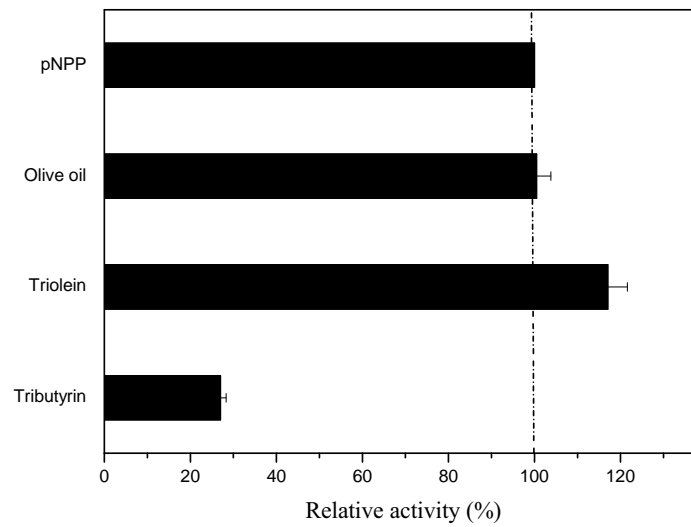


Figure 1. Hydrolytic activity of *C. viswanathii* lipase on different triacylglycerols and pNPP. Culture conditions: cultivations were performed in Vogel's medium with 2% (w/v) olive oil, pH 6.0, 72 h, 180 rpm at 28°C.

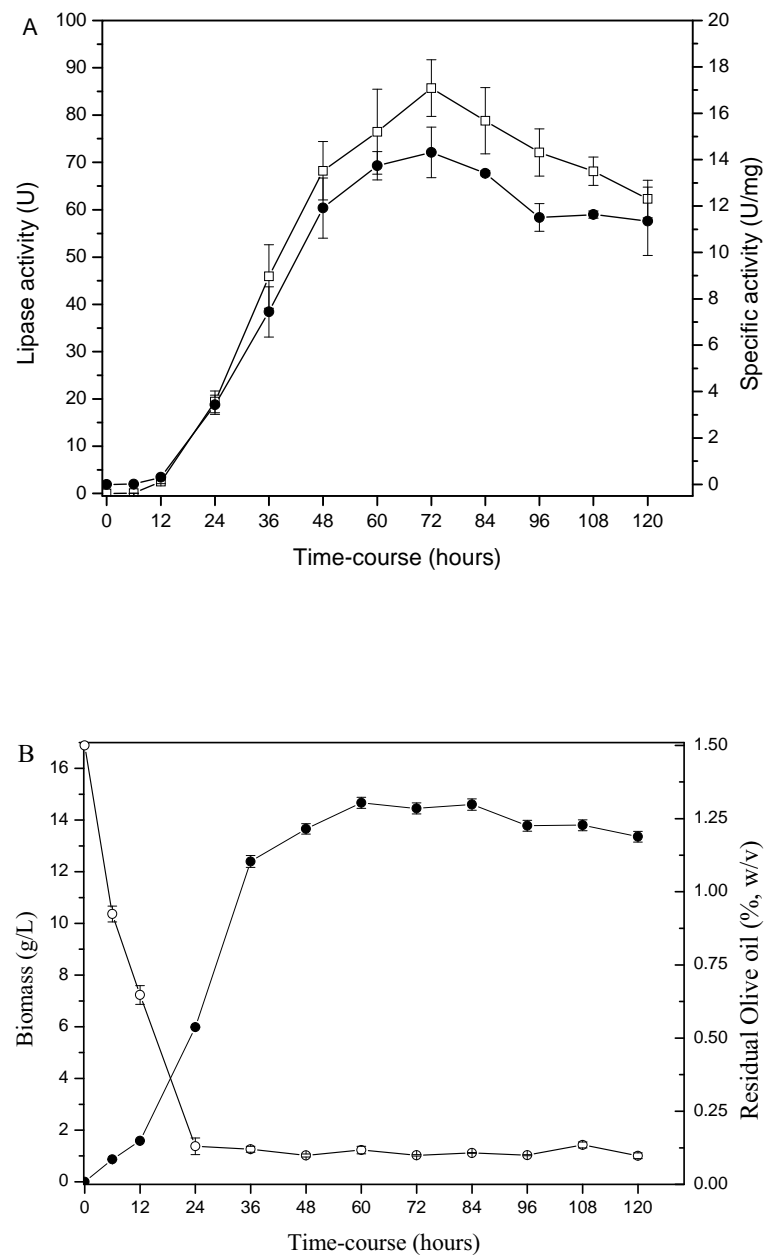


Figure 1. Time-course of lipase production (A), growth and residual olive oil (B) by *C. viswanathii*. Legend: (□) lipase activity, (■) specific lipase activity, (●) biomass, (○) olive oil residual. Culture conditions: Vogel's medium, 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract, pH 6.0, 180 rpm at 28°C.

Capítulo 3

**Production and biochemical properties of a new extracellular acid
lipase from *Candida viswanathii***

Abstract

The influences of the different culture conditions (i.e., agitation speed, pH, temperature and emulsifier) and the biochemical characterization of the crude *Candida viswanathii* lipase were investigated in this study. Highest lipase activity was observed at 210 rpm, pH 6.0 and 27.5 °C (101.1 U). Soy lecithin increased lipase production 1.45-fold and decreased specific activity to 2.3 U/mg protein. The *C. viswanathii* lipase presented optimum activity at pH 3.5 and at 40 °C. The enzyme was very stable at pH 4.0-5.0 and retained approximately 80% of its activity at 3.5 and 5.5 – 8.0. After 24 h of incubation, the enzyme maintained over 80% of its activity in a broad pH range, retaining 99.8% of its activity at 40 °C and 62.6% at 45 °C. Crude lipase maintained above 80% activity in the presence of 1% organic solvents (DMSO, methanol, acetonitrile, ethanol, acetone, 1-propanol, isopropanol and 2-propanol) and was slightly activated with NaCl. The enzyme was strongly inhibited by SDS and Triton X-100, but not by gum Arabic and EDTA. Crude lipase was active for a broad triacylglycerols hydrolysis. The results show that this novel acid lipase of the *Candida* genus has potential applications in oleochemical and food industries.

Keywords: *C. viswanathii*, acid lipase, biochemical properties, triacylglycerol hydrolyze, production

Introduction

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) are responsible for the hydrolysis of triglyceride ester bonds into diglycerides, monoglycerides, fatty acids and glycerol in a complex phenomenon of interfacial activation. These enzymes are capable not only of hydrolyzing ester bonds but also of transesterifying triglycerides, enabling the resolution of racemic mixtures and synthesis of esters bonds in non-aqueous media (HOUDE et al., 2004). Consequently, the main industrial applications of lipases are in the production of detergents, cosmetics, pharmaceuticals, food and biodiesel (HOUDE et al., 2004; LI and ZONG, 2010).

Lipases are ubiquitous and indispensable for bioconversion in nature. They occur in plants, animals and microorganisms, and hence are accordingly classified as plant, animal and microbial lipases (SHARMA et al., 2001). Most of the lipases produced commercially and used with biotechnological purposes are isolated from fungi, yeast and bacteria (SALIHU et al., 2012; CONTESINI et al., 2010; LI and ZONG, 2010). Microbial lipases show a broad spectrum of industrial application due to their greater stability, broad substrate specificity and low-cost production when compared to other sources (TREICHEL et al., 2010). Submerge fermentation processes for the lipolytic enzymes production usually employ renewable low-cost hydrophobic substrates such as vegetable oil, poultry fat, tallow, waste fats, soapstocks, rapeseed oil, grease-containing waste water, etc (FIKERS et al., 2004). These substances used as carbon sources for the synthesis of high-added value metabolites, e.g. single-cell protein, microbial lipids, organic acids, biosurfactants and lipases, by *Yarrowia lipolytica*, *Candida rugosa* and *Rhizopus* sp. are considered of great economical and ecological significance (PAPANIKOLAOU et al., 2007).

Environmental factors such as oxygen, temperature, pH and agitation are important parameters affecting extracellular lipase production and should be considered in submerged process. Agitation and oxygenation of the fermentation culture are significant factors that usually affect lipase production; thus, these parameters should be specifically studied in the course of the scale up process (LIN et al., 2006; ELIBOL and OZER, 2000, SALIHU et al., 2011). On the other hand, parameters such as temperature and pH can be determined in shake-flasks fermentations (DUTTA and RAY, 2009).

Another important point considered in lipase studies is the biochemical characterization of the crude lipases. This is an indirect way frequently used to explore the catalytic properties of pure enzymes, since no large quantities of pure enzymes can be

obtained after purification (DE LA CASA et al., 2006). Moreover, in lipase industrial applications, homogenous preparations are not required. Crude microbial lipases were applied for biodiesel production (GUPTA et al., 2011)

Among ninety fungal strains, *Candida viswanathii* was previously selected as the best lipase producer. In the present study, the influence of environmental factors such as agitation, pH and temperature and surfactant supplementation was investigated to improve the fermentation process. Additionally, the lipase produced under optimized conditions was biochemically characterized and the vegetable oils hydrolysis evaluated.

Materials and methods

Microorganisms and growth conditions

C. viswanathii strain is available in the Culture Collection of the Environmental Studies Center – CEA/UNESP, Brazil. *C. viswanathii* was cultivated on malt extract agar (MEA) for 3 days, at 28 °C, for inoculum preparation. Liquid cultures were prepared with modified Vogel's salts (VOGEL, 1956) containing 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract and the pH was adjusted for each experiment. Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 25 mL of medium were inoculated with 1.0 mL of cells suspension (1.0×10^7 cells/mL) and incubated at different conditions as indicated subsequently. All cultures were developed in triplicate and the results are presented as mean values.

Biomass was separated from the fermentation broth by filtration (membrane 0,45µm cut-off). Cell-free broth was used for lipase activity quantification. Biomass was dried at 105°C until constant mass.

Effect of agitation on lipase production

The culture was carried out in an orbital shake at 150 rpm, 180 rpm and 210 rpm. Initial pH was adjusted to 6.0 and the incubation temperature was 27.5 °C. Fermentation parameters were monitored in different intervals for 96 h.

Effect of initial pH and temperature on lipase production

The effect of initial pH on lipase production was analyzed from 3.0 to 10.0. The initial medium pH was adjusted by the addition of NaOH 1M or HCl 1M. Cultures were carried out for 72 h, 210 rpm orbital shake, at 27.5 °C. The temperature influence on lipase production was verified from 20 to 40 °C, with intervals of 2.5 °C. Cultures were carried out for 72 h, 210 rpm orbital shake and pH 6.0.

Effects of emulsifiers and surfactants on lipase production

The influence of different surfactants as Tween 20, Tween 80, Triton X-100 and emulsifiers as Arabic gum, soybean lecithin and sodium deoxycholate on lipase secretion were added to the production medium at 0.1% (w/v). Cultures were carried out for 72 h, 210 rpm orbital shake, pH 6.0 at 27.5 °C.

Analytical methods

Lipase activity assay

Lipase activity was assayed with *p*-nitrophenyl-palmitate (pNPP) as substrate (YANG et al., 2002). pNPP was first dissolved in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide, then diluted to 50 mM with 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 0.5% Triton X-100. The hydrolysis of pNPP was determined discontinuously at 37°C by releasing of *p*-nitrofenol (pNP). After 5 min of pre-incubation of 0.9 mL of this substrate solution in water bath, the reaction was started by adding the appropriately diluted sample to 1 mL final volume. The reaction was stopped at different intervals by heat shock (90°C, 1 min), followed by the addition of 1 mL sodium saturated sodium tetraborate solution. The absorbance was measured at 405 nm (molar extinction coefficient for pNP: $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Controls were prepared without enzyme. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of the product pNP per mL per min.

Protein analysis

The protein was determined by the Lowry method (LOWRY, 1951), using bovine serum albumin as standard.

Enzyme characterization

Optimum pH and pH lipase stability

Enzyme activity was measured at 37 °C in different pH values using glycine-HCl 0.05 M buffer from 2.0 to 3.0 and McIlvaine buffer from 3.0 to 8.0. Enzyme stability was carried out in McIlvaine buffer in a pH range from 3.0 to 8.0. Enzyme preparation was diluted in the buffer (1:2, v/v) and incubated for 72 h at 10 °C.

Optimum temperature and lipase thermal stability

The optimum temperature was determined by the reaction mixture incubation from 25 to 60 °C, in the McIlvaine buffer pH 4.0. Thermal stability was carried out at 40, 45, 50 and 60 °C. Enzyme preparation was incubated in McIlvaine buffer pH 4.0 and the residual activity was determined in McIlvaine buffer pH 3.5 at optimum temperature for the enzyme.

Effect of surfactants and solvents on lipase activity

Triton X-100, Tween 20, Tween 80 and Arabic gum were added to the reaction medium at 0 to 1.0% (w/v).

Methanol, ethanol, acetone, isopropanol, acetonitrile, 1-propanol, 2-propanol and dimethylsulfoxide (DMSO) were added at 1% (v/v) and 10% (v/v) to the reaction medium. The relative activities were expressed as a percentage of the control.

Effect of substances on lipase stability

Crude enzyme was incubated at 40 °C for 1 h in the presence of substances: ZnSO₄, MgSO₄, NaCl, Pb(COO₃), BaCl₂, CoCl₂, NH₄Cl, Pb(CH₃COO)₂, CaCl₂ and EDTA, at final concentration 10 mM and 20 mM.

Hydrolysis of triacylglycerols

The hydrolysis of pure (tributirin, triolein) or natural oils (canola, castor, lard, linseed, maize, palm, poultry, olive, soybean and sunflower) was developed at 40 °C by following the fatty acids released titration. The oils (10%, w/v) were emulsified in McIlvaine buffer pH 4.0, containing 5% (w/v) Triton X-100. The reaction was started by adding 1 mL of sample to 5 mL of this emulsion, and then maintained for 30 min at 300 rpm orbital agitation. The reaction was interrupted by adding 16 mL of an acetone:ethanol solution (1:1, v/v) to the mixture. The fatty acids released were titrated to pH 11 with a 0.05 M NaOH solution. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol of fatty acid per mL per min. The results were expressed as percentage of triolein hydrolyzed.

Results and discussion

Effect of the agitation speed on lipase production

Preliminary studies demonstrated very low growth rate and no lipase production in static cultures. The subsequent experiment evaluated the agitation effect on the *C. viswanathii* growth and lipase production. At the three specified agitations speeds, lipase production was found to be growth-associated with maximal lipase production at stationary phases after 72 h cultivation (**Figure 1**). The maximal values of lipase production and biomass were obtained at 210 rpm with values of 99.45 U and 21.81 g/L, respectively. For cultures at 150 rpm and 180 rpm, the lipase production corresponded to 46.50 U and 95.00 U and the cell growth to 12.10 g/L and 17.45 g/L, respectively. Specific activity values followed the same tendency at the three agitation speeds, with the highest value (14.31 U/mg protein) under 210 rpm agitation,

after 86 h of cultivation. The decrease in the extracellular lipase activity observed after 72 h cultivation can be attributed to the hydrolytic action of proteases (PUTHLI et al., 2006) or to the decrease in cell growth or adsorption of the enzyme produced at the aqueous-organic interface (TAKAÇ et al., 2010).

Other fermentation parameters were analyzed at 210 rpm after 72 h, including biomass yield ($Y_{X/S} = 1.456$ g/g), lipase yield ($Y_{L/S} = 6.638$ U/g), biomass productivity ($P_X = 0.303$ g/h), lipase productivity ($P_L = 1.381$ U/h) and specific rate of lipase production ($q_L = 0.062$ U of lipase/g of biomass.h) (**Table 1**). The biomass yield obtained was higher than those found in the literature, which present values considered satisfactory for single-cell protein fermentation from fatty acids, around 0.5 – 0.7 g/g (KAMZOLOVA et al., 2005; PAPANIKOLAOU et al., 2007; DARVISHI et al., 2009).

The results obtained in shake flasks are similar with those obtained using agitation speeds in bioreactors (DOMINGUEZ et al., 2005; TAKAÇ et al., 2010; SALIHU et al., 2011). Brozzoli et al. (2009) showed that lipase production by *Candida cylindracea* NRRL Y-17506 in olive mill wastewater was significantly affected by stirring speed using fixed aeration of 1.0 vvm. Elibol and Ozer (2000) reported that the variation in agitation speed for the *Rhizopus arrhizius* cultures resulted in a change in oxygen transfer rate, which in turn affected the rate and extent of cell growth and lipase production. However, in this study, the agitation speeds in the cultures did not successfully reduce time period for the production process and increase lipase yield in shake flasks. These results could be achieved in batches bioreactor which have considerable advantages over shake flasks cultivation in terms of lipase production and yield (TAKAÇ et al., 2010). Gulati et al. (2000) reduced the time period for lipase production of *Aspergillus terreus* from 96 h in shake flask to 54 h in a bioreactor with controlled dissolved oxygen and agitation. Nevertheless, previous shake flask culture is an important step for cell growth and lipase production comprehension and can play an important role in the scale-up process.

Effect of pH and temperature on lipase production

The initial pH of the fermentation is one of the important physical parameters affecting microbial growth and enzyme synthesis by *Candida spp.* strains (VALERO et al., 1988; BROZZOLI et al., 2009; ALI et al., 2010). Cultivation with different initial media pH

was used to evaluate the lipase production by *C. viswanathii* (**Table 2**). The lipase production increased with the pH up to the pH 6.0, in which the lipase production was maximal (100 U). The highest specific activity (13.82 U/mg protein) and biomass (19.1 g/L) were also verified at this pH. A high production level was also observed at pH 5.0. Ali et al. (2010) reported maximum lipase production by *C. lipolytica* at an initial pH 6.0. An initial pH of 4.5 was reported as optimal for lipase production by *Yarrowia lipolytica* in continuous fermentation (DEIVE et al., 2010). At neutral and alkaline culture conditions, the lipase production decreased, whereas biomass levels remained constant (around 15 g/L). An optimal alkaline initial medium pH for lipase production was found for the yeast *Pichia lynferdii* at pH up to 7.0 (KIM et al., 2010) and the bacteria *Bacillus pumilus* at pH 9.0 (SANGEETHA et al., 2008).

The cultivation temperature ranging from 20 to 40°C and its effects in the cell growth and lipase production were analyzed, maintaining the conditions previously established (72 h cultures, agitation 210 rpm and pH 6.0). When the incubation temperature was increased, lipase production, and cell growth also increased up to 27.5 °C (**Figure 2**). Maximum cell growth was also reached at 27.5 °C (20.3 g/L), decreasing substantially up to 40 °C (10.9 g/L). In this same temperature, the higher lipase production and specific activity was also achieved (101.25 U and 13.9 U/mg) up to 27.5 °C, both lipase production and specific activity remained in high levels until 32.5 °C. On the other hand, at 20.0 and 22.5 °C lipase activity was 17.25 and 22.5 U, respectively.

These results are consistent with those from Lin et al. (2006) who demonstrated that temperature control during submerged cultures is a critical factor that can greatly reduce the productivity of the system even with relatively small variations. *C. viswanathii* was sensitive to variations of 2.5 °C for enzyme production and growth. Although several microorganisms have been investigated to produce lipase in cold or hot temperatures (DOMINGUEZ et al., 2005; YU et al., 2009), most of them present optimum temperature for enzyme production between 25 to 30 °C (BAPIRAJU et al., 2005; ALI et al., 2010; KUMAR et al., 2011).

Effect of surfactants and emulsifiers on lipase production

Surfactants and emulsifiers can enhance extracellular lipase production during the fermentation process due to emulsify the substrate, increase the accessibility to substrates,

change the permeability of the cell, surfactant effects on cell bound enzyme or they can be still used as carbon sources. The influence of surfactants Tween 20, Tween 80, Triton X-100, Arabic gum, soy lecithin and sodium deoxycholate on cell growth and lipase production is presented in **Table 3**. Soy lecithin was the only one that increased lipase production (147.50 U), however the specific activity (2.3 U/mg) and cell growth decreased (18.0 g/L) in the presence of this substance. Soy lecithin is composed by specific phospholipids, triglycerides and other non-phospholipids compounds and can be considered a non-toxic surfactant, being completely metabolized by organisms (SCHOLFIELD, 1981), which may have increased lipase production by *C. viswanathii*. Tween 20, Tween 80, Triton X-100, gum Arabic and sodium deoxycholate reduced lipase production and decreased the cell growth. The lowest lipase production and cell growth values were observed with Triton X-100 (5.75 U and 5.6 g/L, respectively). Domínguez et al. (2003) reported that surfactants did not significantly increase lipase production by *Y. lipolytica*, whereas the *Rhizopus chinensis* lipase production decreased when surfactants were added to the culture medium (POGORI et al., 2008).

Biochemical properties of C. viswanathii lipase

Effect of pH on activity and stability

The effect of pH on lipase activity and pH stability are shown in **Figure 3**. The lipase activity (100%) was maximal at pH 3.5 (**Figure 3a**). This enzyme slightly decreased at pH 5.0 (67.4%), showing 68 – 60% of its activity at pH 7.0 and rapidly reduced to 29% at pH 8.0. At pH range 2.0 – 3.0, lipase activity maintained 45 to 53%, respectively. The enzyme was more stable in the pH range from 4.0 to 5.0, retaining almost 100% of activity after 24 h. At pH range from 5.5 to 8.0 the residual activity remained around 80% (**Figure 3b**). Residual activity remained above 50% at pH 3.0 and at 8.5 – 9.0; however, at pH range from 2.0 – 2.5 and 10.0 the enzyme was completely inactivated.

The optimum acid pH of *C. viswanathii* lipase activity is different from other *Candida* lipases that presented optimal pH range in alkaline conditions. *Candida rugosa* lipase had optimal activity at pH 7.5 (KHOR et al., 1986). Lipase from *Candida antartica* showed the highest activity at pH 8.0 and the enzyme was stable at pH range of 7.0 – 9.0 after 24 h (ADAMCZACK, 2003). *Candida cylindracea* lipases A and B showed similar pH-profiles

using tributyrin as substrate, with optimum activity around pH 7.0. However, the decrease in activity at pH 8.0 was more pronounced in lipase B, whereas lipase A was less active at pH 5.0 (Rua et al., 1993). An acid lipase with optimal activity at pH 2.5 was produced by *Aspergillus niger* NCIM 1207 (MHETRAS et al., 2009). This lipase decreased significantly when the pH was increased to 4.0 and its stability at alkaline pH range of 8.0–11.0 retained 100% of its original activity after incubation for 24 h. Maximal activity of *Pseudomonas gessardii* lipase was observed at pH 5.0; however above pH 7.0, the activity rapidly decreased, retaining 33% of its activity at pH 9.0 (RAMANI et al., 2010).

Effect of temperature on activity and thermal stability

The *C. viswanathii* lipase activity increased with temperature from 25 °C up to 40 °C (**Figure 4a**). The highest activity was observed at 40 °C (10.9 U/mL, 100%), and elevated activity was also found at 45 °C (96.3%) and 50 °C (87.2%). Lipase activity rapidly reduced to 32.8% at 60 °C, and retained 56.9% of its activity at temperature of 25 °C. Mostly fungal lipases present maximal activity at temperatures ranging from 30 to 60 °C. *C. antartica* lipase showed optimum activity at 35 °C (ADAMCZACK, 2003). Mateos Diaz et al. (2006) showed that the maximal activity of the lipase produced by *Rhizopus homothallicus* in submerged fermentation or solid state fermentation differed between 30 and 40 °C. *Fusarium oxysporum* produced an alkaline lipase with maximum activity at 50 °C (PRAZERES et al., 2006). The highest lipolytic activity against pNPP of the *Penicillium aurantiogriseum* was observed at 60 °C (LIMA et al., 2004).

The crude lipase retained 99.8% of its activity after 24 h at 40 °C (**Figure 4b**), showing 66.9% of its activity after 72 h (data not shown). At 45 °C, 62.6% of lipase activity was recovered after 24 h, while at 50°C, 50% of residual activity was observed after 0.9 h. The enzyme was not stable at temperature of 60 °C, and only 8.3% residual activity was verified after 1h of incubation. Purified *C. antartica* lipase showed optimal activity at 35 °C and maximal stability at 30 °C. This enzyme showed a rapid decrease in activity at 45 °C, after 1 h of incubation (ADAMCZACK, 2003). Ramani et al. (2010) suggested that the thermal stability at comparatively higher temperature may be due to the influence of factors such as broad pH stability, metal ions and the rigidity in the lipase structure.

Effects of surfactants and organic solvents on lipase activity

The influence of the surfactants on the lipase activity determination is shown in **Figure 5**. Triton X-100 was the most effective surfactant for the measurement of the p-nitrophenyl-palmitate hydrolysis. The highest activity was observed when the Triton X-100 concentration reached 0.5% (11.2 U/mL). Tween 20, Tween 80 and Arabic gum were not effective for emulsifying the substrate and facilitate the hydrolysis of the p-nitrophenyl-palmitate. Delorme et al. (2011) reported that the surfactants have significant effects on the conformations of the lipases and they can also decisively influence lipases activities as well as their inhibition. Mateos Díaz et al. (2007) suggested that Triton X-100 not only induces a general increase in the specific activity of the *Rhizopus homothallicus* lipase produced in solid stated fermentation, but also affects its chain length specificity.

Lipase stability in organic solvents is an essential prerequisite for lipase applications in organic synthesis (DOUKYU and OGINO, 2010), hence the effects of organic solvents on the lipase activity in the hydrolysis reactions are considered novel attributed in a lipase (DHEEMAN et al., 2011). *C. viswanathii* lipase activity was determined after addition of polar organic solvents in the reaction at final concentration of 1% (v/v) and 10% (v/v) (Table 4). At 1% (v/v) concentration, methanol, ethanol, 1-propanol and DMSO had no effect on lipase activity. In the presence of acetonitrile, acetone, isopropanol and 2-propanol at 1%, *C. viswanathii* lipase retained approximately 90% of its activity. At 10% (v/v), methanol and DMSO weakly affected the lipase activity and ethanol had a moderate effect under this condition. However, isopropanol, acetone, 2-propanol, 1-propanol and acetonitrile drastically reduced the lipase activity. Ogino and Ishikawa (2001) reported that direct contact of a polar organic solvent in monophasic systems with an enzyme can result in severe enzyme structure distortion, rapid denaturation and even complete inactivation.

Effect of substances and surfactants on lipase stability

The effect of different metal ions and surfactants on the activity of the lipase is shown in **Table 5**. Among the metal ions assayed, only Na⁻ increased the activity at 10 mM and 20 mM (110.4% and 117.4%, respectively), whereas Mg⁺², Ba⁺², NH₄⁻, Ca⁺² had no significant effect on the activity. Usually, fungal lipases can be activated by adding Mg²⁺, Ca²⁺, NH₄⁻ and

Ba²⁺ ions to the reaction media (MATEOS DÍAZ et al., 2006; SUPAKDAMRONGKUL et al., 2010). However, the crude *C. viswanathii* lipase was not activated by these ions. ZnSO₄ reduced the activity to 84.4% and to 60.0% at 10 mM and 20 mM, respectively, and CoCl₂ reduced activity to 60.8% and 42.7%, respectively. ZnSO₄ was previously reported as an inhibitor of lipase from *Penicillium* sp. (DHEEMAN et al., 2011), whereas CoCl₂ inhibited the lipase from *Rhizopus homothallicus* (MATEOS DÍAZ et al., 2006). The addition of the chelating agent EDTA did not affect enzyme activity, indicating that *C. viswanathii* lipase is not a metalloenzyme as reported for other lipases such as those from *Penicillium* sp. (DHEEMAN et al., 2011) and *Aspergillus awamorii* (XIA et al., 2011).

Lipase activity was not affected by gum Arabic. In the presence of Tween 80, the highest inhibition was observed at 5% (60.5%). Tween 20 at 1% and 5% inhibited the activity to 88.2% and 52.5%, respectively. SDS completely inactivated the enzyme and Triton X-100 was a strong lipase inhibitor, reducing the activity to 30.3% and 26.9% at both concentrations. The lipase from *A. awamorii* lipase was also inhibited by non-ionic detergents (XIA et al., 2011). The inhibition of the lipase by an ionic surfactant, such as SDS, can be due the formation of complexes with protein in solution altering the conformational stability and the hydrophobicity of the protein surface. Additionally, partial or complete unfolding of the tertiary protein structure can be affected, due to additional hydrophobic interaction (DELORME et al., 2011).

Hydrolytic activity on triacylglycerols

The hydrolytic activity of the lipase on pure and natural triacylglycerols is shown in **Figure 6**. The highest hydrolytic activity was observed for triolein (100%), olive oil (85.7%), palm oil (83.3%), soybean oil (78.6%), canola oil, castor oil (69.0%) and sunflower oil (64.3%). Intermediary hydrolytic activity was observed for poultry fat (59.5%), lard (54.8%) and maize oil (50.0%). Crude *C. viswanathii* lipase showed the lowest activity on tributyrin (45.5%). These results suggest that this enzyme is more active on long chain fatty acids; however enzyme. *C. viswanathii* lipase was able to hydrolyze a broad spectrum of fatty acid chain-lengths. Similar results were found for lipases from *Penicillium camembertii* (TAN et al. 2004), *Colletotrichum gloesporioides* (COLEN et al. 2006), and *Pseudomonas gessardii* (RAMANI et al. 2010).

Concluding remarks

The present study demonstrated the importance of controlling physico-chemical parameters for lipase production by *C. viswanathii*. Agitation was essential for the lipase production by this yeast. The culture temperature and pH strongly influenced the lipase production, and minimal variations in these parameters negatively affected the synthesis of this enzyme. In medium supplemented with soy lecithin, the lipase production increased 1.45-fold. The biochemical characterization of the crude *C. viswanathii* lipase revealed that this is an enzyme with different properties compared to those found for other *Candida spp.* lipases. The optimal activity at acid pH can suggest a new lipolytic enzyme for the genus. Optimal activity was observed at pH 3.5 and 40 °C. In addition, crude lipase presented high stability in acid conditions and was highly stable at 40 and 45 °C. Crude lipase remained active in the presence of organic solvents at low concentration and at high concentration of DMSO and methanol. The enzyme was not activated by metal ions and the activity was strongly reduced in the presence of SDS and Triton-X-100. *C. viswanathii* lipase presented a broad specificity for triacylglycerols hydrolysis suggesting that this enzyme can be applied in lipid digestion and biotransformation.

References

- ADAMCZAK, M. Synthesis, properties, and application of lipase from *Candida antarctica* for high yield monoacylglycerol biosynthesis. **Polish Journal Food Nutrition Science**, vol. 12/53, no. 4, p. 3-8, 2003.
- ALI, S.; RAFI, H.; UL-HAQ, I. Production of an extracellular lipase from *Candida lipolytica* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design. **Engineering Life Science**, vol. 10, no. 5, p. 465 – 473, 2010.
- BAPIRAJU, K.V.V.S.N.; SUJATHA, P.; ELLAIAH, P.; RAMANA, T. Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus sp.* BTNT-2. **Journal Basic of Microbiology**, vol. 45, no. 4, p. 257– 273, 2005.
- BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; SAMPEDRO, I.; FEDERICI, F.; ANNIBALE, A.D.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 3395–3402, 2009.

- CAVALCANTI, E.D.A.C; GUTARRA, M.L.E.; FREIRE, D.M.G.; CASTILHO, L.R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G.L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.48, p. 79-84, 2005.
- COLEN, G.; JUNQUEIRA, G.G.; MORAES-SANTOS, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 22, p. 881–885, 2006.
- CONTESINI, F.J.; LOPES, D.B.; MACEDO, G.A.; NASCIMENTO, M.G.; CARVALHO, P.O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 67, p. 163–171, 2010.
- DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; MOMENBEIK, F. Effect of plant oils upon lipase production and citric acid production in *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-7, 2009.
- DE LA CASA, R.M.; SINISTERRA, J.V.; SÁNCHEZ-MONTERO, J.M. Characterization and catalytic properties of a new crude lipase from *C. rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 38, p. 599–609, 2006.
- DHEEMAN, D.S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J.M.; HENEHANA, J.T.M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, p. 256–262, 2011.
- DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A.; LONGO, M.A. A comprehensive study of lipase production by *Yarrowia lipolytica* CECT 1240 (ATCC 18942): from shake flask to continuous bioreactor. **Journal of Chemical and Technology Biotechnology**, vol. 85, p. 258–266, 2010.
- DELORME, V.; DHOUIB, R.; CANAAN, S.; FOTIADU, F.; CARRIÈRE, F.; CAVALIER, J.F. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. **Pharmaceutical Research**, vol. 28, p. 1831–1842, 2011.
- DOMÍNGUEZ, A.; DEIVE, F.J.; SANROMÁN, M.A.; LONGO, M.A. Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Chemical and Technology Biotechnology**, vol. 78, p. 1166–1170, 2003.
- DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M.A.; RÚA, M.L.; SANROMAN, M.A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 26, p. 95–99, 2005.
- DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 48, p. 270–282, 2010.
- DUTTA, S.; RAY, L. Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 159, p. 142–154, 2009.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, vol. 26, p. 325-29, 2000.

- FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 96, p. 742–749, 2004.
- GUPTA, P.; UPADHYAI, S.B.; SHRIVASTAVA, R. Lipase catalysed-transesterification of vegetable oils by lipolytic Bacteria. **Research Journal of Microbiology**, vol. 6, no. 3, p. 281–288, 2011.
- GULATI, R.; SAXENA, R.K.; Gupta, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, vol. 36, p. 149–155, 2000.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 118, p. 155–170, 2004
- KAMZOLOVA, S.V.; MORGUNOV, I.G.; AURICH, A. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 43, p. 113–122, 2005.
- KIM, H.K.; KIM, I.H.; HOU, C.T.; KWON, K.I.; SHIN, B.S. Production of a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* Y-7723. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, vol. 58, p. 1322–1326, 2010.
- KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. **JAACS**, vol. 63, no. 4, 1986.
- KUMAR, R.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SINGH, D. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. **New Biotechnology**, vol. 28, no. 1, p. 65–71, 2011.
- LI, N.; ZONG, M.H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 66, p. 43–54, 2010.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 18, p. 65–71, 2004.
- LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 98–102, 2006.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, p. 265–275, 1951.
- MATEOS DIAZ, J.C.; RODRÍGUEZ, J.A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 1042–1050, 2006.

- MELO, W. C.; SANTOS, A. S.; SANTA ANNA, L.M.M.; PEREIRA, Jr. N. Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from castor bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: detoxification and biodiesel process integration. **Journal Brazilian Chemical Society**, vol. 19, p. 418-425, 2008.
- MHETRAS, N.C.; BASTAWDE, K.B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 1486–1490, 2009
- OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 91, no. 2, p. 109-116. 2001.
- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTU, M.; KOMATIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 10, no. 3, 2007.
- POGORI, N.; CHEIKHYOUSSEF, A.; XU, Y.; WANG, D. Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. **Biotechnology**, vol. 7, no. 4, p. 710-717, 2008.
- PRAZERES, J.N.; CRUZ, J.A.B.; PASTORE, G.M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 37, p. 505-509, 2006.
- PUTHLI, M.S.; RATHOD, V.K.; PANDIT, A.B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 27, p. 287–294, 2006.
- RAMANI, K. KENNEDY, L.J.; RAMAKRISHNANA, M.; SEKARANA, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, vol. 45, p. 1683–1691, 2010.
- SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I. Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. **The Internet Journal of Microbiology**, vol. 5, no. 2, 2008.
- SALIHU, A.; ALAMA, M.Z.; KARIMA, M.I.A.; SALLEHA, H.M. Effect of process parameters on lipase production by *Candida cylindracea* in stirred tank bioreactor using renewable palm oil mill effluent based medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, p. 187– 192, 2011.
- SALIHU, A.; ALAM, M.Z.; KARIM, M.I.A.; SALLEH, H.M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources, Conservation and Recycling**, vol. 58, p. 36– 44, 2012
- SCHOLFIELD, C. R. Composition of Soybean Lecithin . **Journal of the American Oil Chemists Society**, vol. 58, no. 10, p. 889-892, 1981.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, vol. 19, 627–662, 2001.

- SINGH, M.; SAURAV, K.; SRIVASTAVA, N.; KANNABIRAN, K. Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrate. **Current Research Journal of Biological Sciences**, vol. 2, no. 4, p. 241-245, 2010.
- SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 105, p. 228–235, 2010.
- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 1495-1502, 2004.
- TAKAÇ, S.; UNLU, A.E.; ERDEN, B. Oxygen transfer strategy modulates the production of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. **Journal of Molecular and Catalysis B: Enzyme**, vol. 64, p. 150-54, 2010.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M.A.; LUCCIO, M.D.; OLIVEIRA, J.V. A review on microbial lipase production. **Food Bioprocess Technology**, vol. 3, p. 182-196, 2010.
- VALERO, F.; AYATS, F.; SANTFN, J.L.; POCH, M. Lipase production by *Candida rugosa*: fermentation behavior. **Biotechnology Letters**, vol. 10, no. 10, p. 741-744, 1988.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetic Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.
- YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through *in vitro* combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**, vol. 15, p. 147-152, 2002.
- YU, H.; HAN, J.; LI, N.; QIE, X.; JIA, Y. Fermentation performance and characterization of cold-adapted lipase produced with *Pseudomonas* Lip35. **Agricultural Sciences in China**, vol. 8, no. 8, p. 956-962, 2009.
- XIA, J.; HUANG, B.; NIE, Z.; WANG, W. Production and characterization of alkaline extracellular lipase from newly isolated strain *Aspergillus awamori* HB-03. **Journal Central South University of Technology**, vol. 18, p. 1425–1433, 2011.

Table 1. Analysis of the lipase production parameters by *C. viswanathii* after 72 h of cultivation.

Speed rotation (rpm)	X	L	$Y_{X/S}$	P_X	$Y_{L/S}$	P_L	q_L
150	12.50	46.60	0.834	0.173	3.108	0.647	0.051
180	17.45	80.20	1.164	0.242	5.350	1.114	0.064
210	21.81	99.45	1.456	0.303	6.638	1.381	0.062

Abbreviations: X, biomass (g/L); L, maximum lipase activity (U); S, substrate (g/L); $Y_{X/S}$, biomass yield on substrate consumed (g/g); $Y_{L/S}$, lipase yield on substrate consumed (U/g); P_X , biomass productivity (g/h); P_L , lipase productivity (U/h); q_L , specific rate of lipase production (U/g of biomass.h)

Table 2. Effect of culture pH on growth and lipase production by *C. viswanathii*

Initial pH	Final pH	Lipase activity (U)	Specific activity (U/mg prot)	Biomass (g/L)
3	5.76 ± 0.02	40.50 ± 4.25	5.10 ± 0.78	11.4 ± 0.1
4	6.46 ± 0.03	58.00 ± 4.50	6.86 ± 0.63	16.4 ± 0.2
5	6.60 ± 0.01	79.50 ± 5.00	8.90 ± 0.88	16.2 ± 0.3
6	6.60 ± 0.14	100.00 ± 3.00	13.82 ± 0.44	18.9 ± 0.1
7	7.05 ± 0,04	33.00 ± 2.25	3.83 ± 0.38	14.8 ± 0.9
8	7.63 ± 0.01	21.25 ± 0.75	2.33 ± 0.22	15.4 ± 0.1
9	7.93 ± 0.11	19.75 ± 2.75	2.47 ± 0.37	15.0 ± 0.4
10	8.14 ± 0.02	22.00 ± 1.75	2.47 ± 0.26	14.7 ± 0.5

Culture conditions: liquid cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract at 27.5 °C, agitated at 210 rpm, for 72 h.

Table 3. Effect of the emulsifiers and surfactants on growth and lipase production by *C. viswanathii*.

Emulsifiers (0.1%, w/v)	Lipase activity (U)	Specific activity (U/mg prot)	Biomass (g/L)
Control	100.00 ± 3.00	13.82 ± 0.44	18.90 ± 0.92
Tween 20	77.50 ± 7.75	11.31 ± 1.14	17.81 ± 0.91
Tween 80	32.50 ± 2.75	5.07 ± 0.45	16.60 ± 0.85
Triton X-100	5.75 ± 0.50	0.89 ± 0.08	5.55 ± 0.62
Arabic gum	65.00 ± 5.25	1.53 ± 0.16	16.83 ± 0.30
Soy lecithin	147.50 ± 4.25	2.33 ± 0.74	17.97 ± 0.36
Sodium deoxicholate	52.50 ± 4.25	0.52 ± 0.04	14.11 ± 1.04

Culture conditions: liquid cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract at 27.5 °C, agitated at 210 rpm, pH 6.0, for 72 h (control).

Table 4. Effect of organic solvents on lipase activity produced by *C. viswanathii*.

Organic solvents	Log <i>P</i> values	Relative activity (%)	
		1%	10%
Control		100 ± 4.5	100 ± 5.6
DMSO	-1.378	98.9 ± 6.9	91.8 ± 6.2
Methanol	-0.764	102.6 ± 5.9	94.0 ± 5.3
Acetonitrile	-0.394	89.8 ± 7.1	16.8 ± 5.2
Ethanol	-0.235	101.9 ± 6.2	60.0 ± 7.5
Acetone	-0.208	88.0 ± 5.4	31.8 ± 4.9
1-Propanol	0.250	109.1 ± 9.1	18.6 ± 9.7
Isopropanol	0.074	91.1 ± 6.3	32.4 ± 5.4
2-Propanol	0.070	88.1 ± 6.5	29.2 ± 9.5

Assay conditions: lipase activities were assayed on *p*NPP hydrolysis using McIlvaine buffer pH 3.5, at 40 °C. Log *P*: logarithm of the partition coefficient (*P*) at an octanol/water two-phase system indicates the solvents hydrophobicity. DMSO: dimethylsulfoxide. Control: lipase was incubated in the same conditions with water.

Table 5. Effect of substances on *Candida viswanathii* lipase stability

Substances	Relative activity (%)	
	10 mM	20 mM
Control	100 ± 4.8	100 ± 4.8
ZnSO ₄	84.4 ± 3.6	60.0 ± 10.0
MgSO ₄	99.9 ± 3.9	96.5 ± 4.0
BaCl ₂	106.7 ± 3.6	98.6 ± 3.7
CoCl ₂	60.8 ± 7.4	42.7 ± 1.0
NaCl	110.4 ± 5.9	117.4 ± 6.8
NH ₄ Cl	106.8 ± 4.2	104.4 ± 3.74
Pb(CH ₃ COO) ₂	95.1 ± 5.0	94.2 ± 6.3
CaCl ₂	103.2 ± 4.4	96.6 ± 4.9
EDTA	103.7 ± 4.2	98.6 ± 6.1
Emulsifiers	1%	5%
SDS	ND	ND
Tween 20	88.2 ± 9.5	52.5 ± 4.9
Tween 80	93.8 ± 8.6	60.5 ± 5.8
Triton X-100	30.3 ± 6.7	26.9 ± 8.7
Arabic gum	107.3 ± 4.8	102.0 ± 5.1

Assay conditions: lipase activities were assayed on *p*NPP hydrolysis after 1 h of incubation using McIlvaine buffer pH 3.5, at 40 °C. Control: lipase was incubated in the same conditions with water.

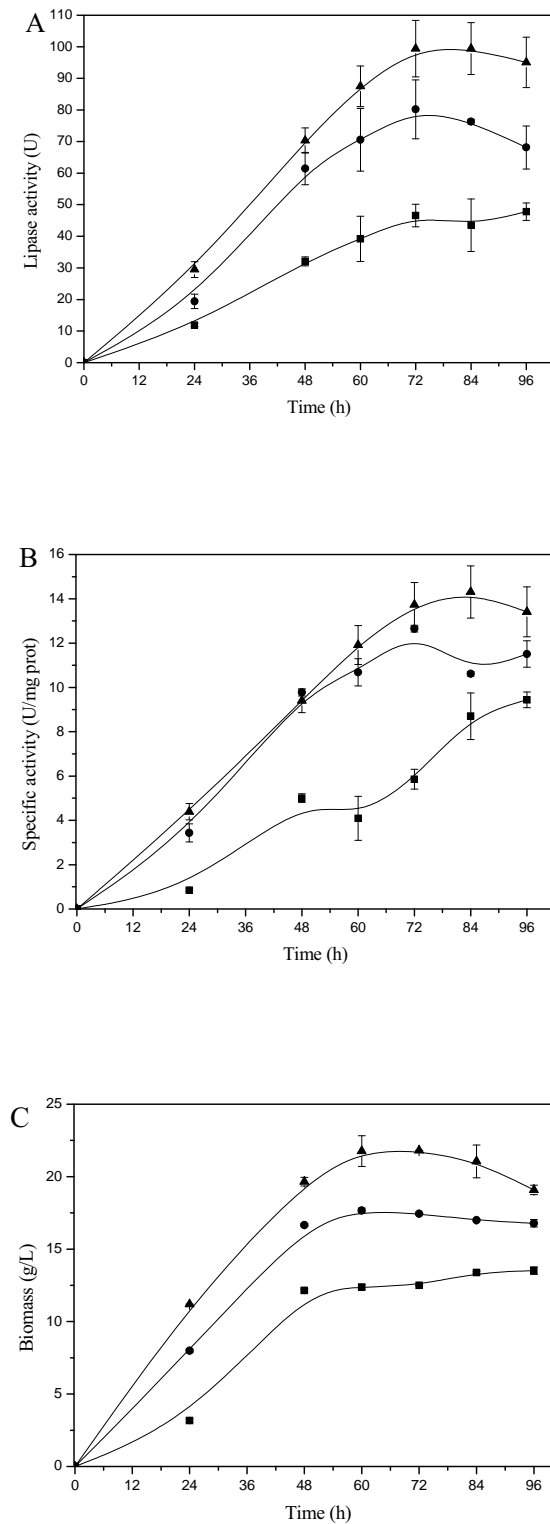


Figure 1. Effect of the agitation speeds in orbital shake on lipase production (A), specific activity (B) and *Candida viswanathii* growth (C). Culture conditions: liquid cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil and 0.2% (w/v) yeast extract, at pH 6.0 and 28 °C. (■) 150 rpm; (●) 180 rpm; (▲) 210 rpm.

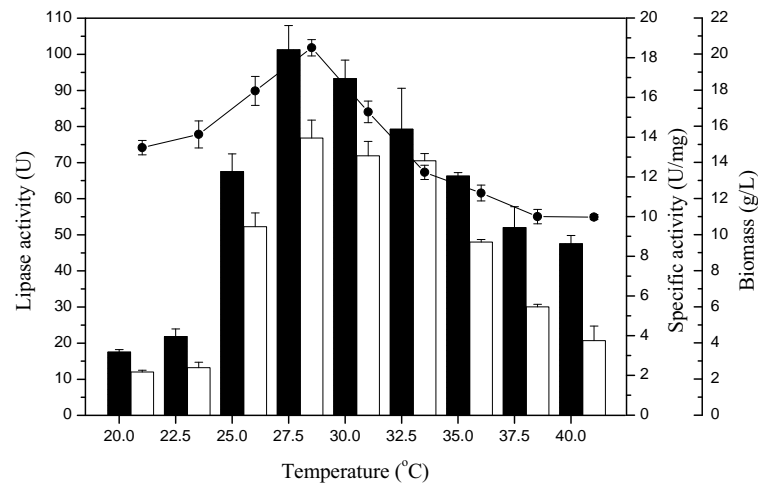


Figure 2. Effect of temperature on growth and lipase production by *C. viswanathii*. Culture conditions: cultures were carried out in Vogel's medium with 1.5% (w/v) olive oil, and 0.2% (w/v) yeast extract, and agitated at 210 rpm, at pH 6.0. (■) Lipase activity, (□) Specific activity, (●) biomass.

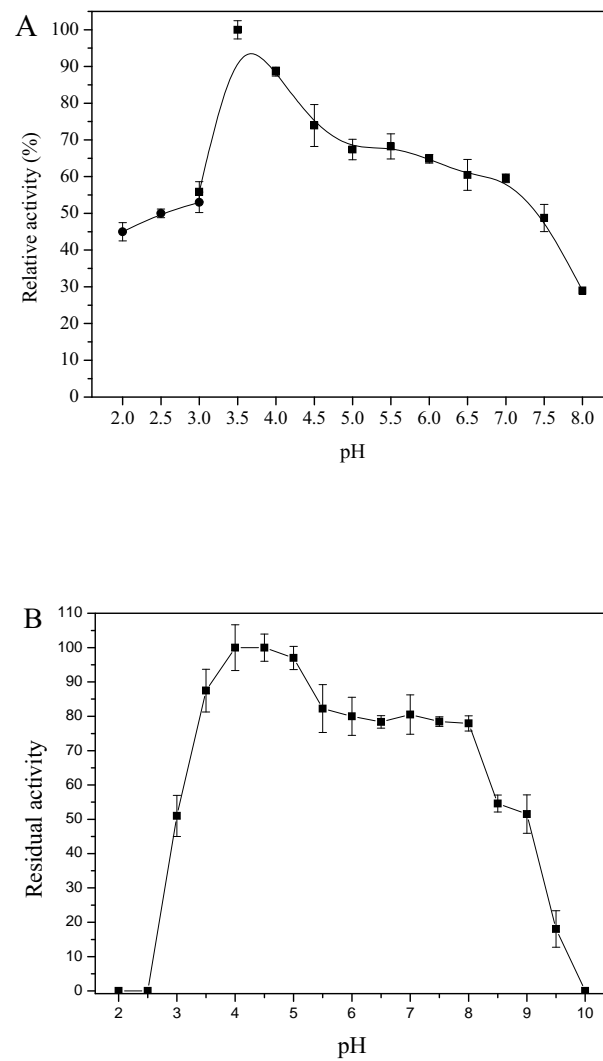


Figure 3. Optimal pH and pH stability of the crude *C. viswanathii* lipase. Assay conditions: 0.05 M glycine-HCl buffer from 2.0 to 3.0 and McIlvaine buffer from 3.0 to 8.0. Lipase activity assays were carried out at 37 °C (a) and in McIlvaine buffer pH 3.5, at 37 °C (b).

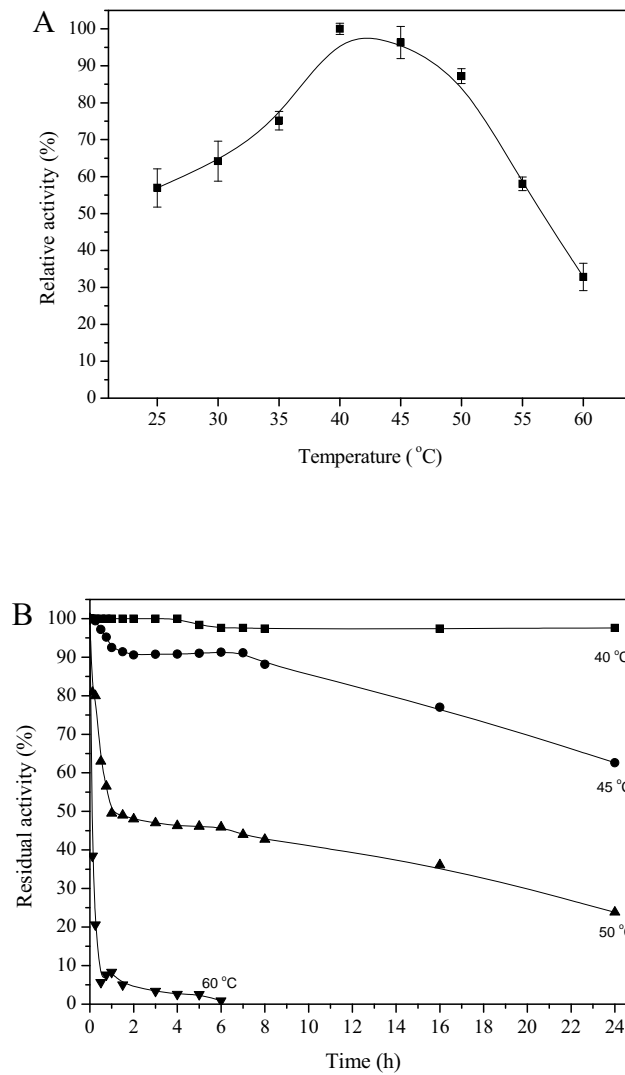


Figure 4. Optimal temperature and thermal stability of the crude *C. viswanathii* lipase. Assay conditions: McIlvaine buffer pH 3.5 (a). The enzymatic preparation was incubated at (■) 40, (●) 45 and (▲) 50 °C, without substrate. The residual lipase activity was assayed with McIlvaine buffer, pH 3.5, at 40 °C (b)

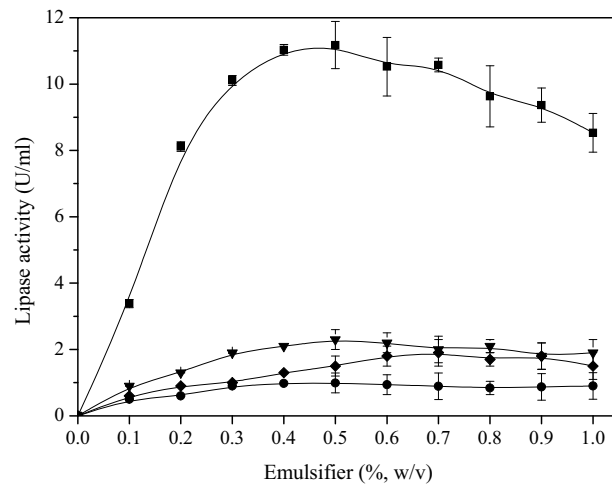


Figure 5. Effect of surfactants on lipase activity produced by *C. viswanathii*. (■) Triton X-100; (▼) Tween 20; (♦) Tween 80; (●) Arabic gum. Assay conditions: lipase activities were assayed on *p*NPP hydrolysis using McIlvaine buffer pH 3.5, at 40 °C.

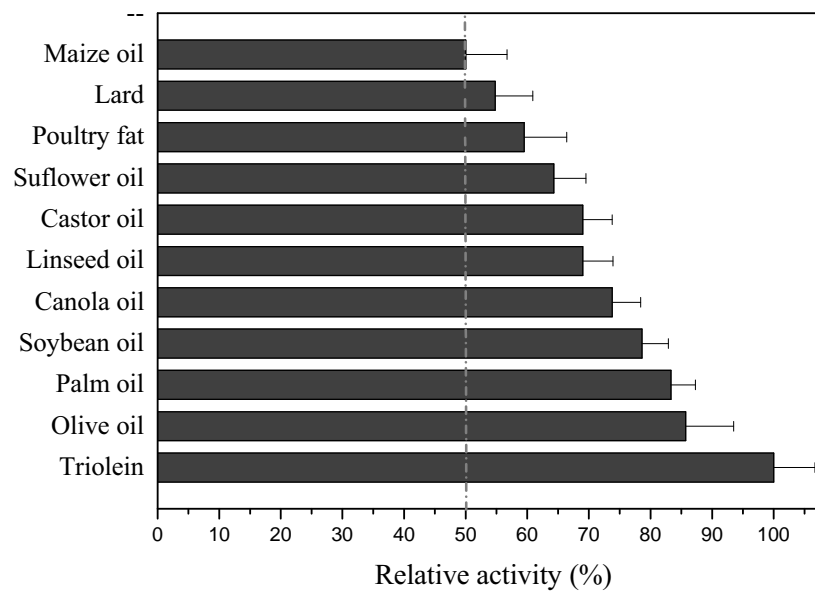


Figure 6. Hydrolysis of triacylglycerols by crude *Candida viswanathii* lipase. Assay conditions: Triacylglycerols hydrolysis were carried out in McIlvaine buffer pH 4.0 with 5% (w/v) Triton X-100 and hydrolysis activities were assayed by titration method.

Capítulo 4

Produção de lipase ácida de *Candida viswanathii* por fermentação sólida em subprodutos agroindustriais e propriedades da enzima

RESUMO

A fermentação em estado sólido tem se tornado uma atraente alternativa para produção de enzimas, como as lipases, especialmente devido às inúmeras vantagens em relação aos processos conduzidos em condição submersa. O objetivo deste trabalho foi selecionar um substrato para a produção desta enzima por uma linhagem de *C. viswanathii*, bem como avaliar outros fatores nutricionais e ambientais que influenciam a produção enzimática. A utilização de uma mistura de farelo de trigo e bagaço de cevada (1:1) suplementado com azeite de oliva promoveu um efeito sinérgico na produção de lipase. Além disso, gordura de frango e extrato de levedura utilizados na suplementação do substrato apresentaram efeito positivo neste processo. As concentrações dos suplementos gordura de frango 40% (m/m), extrato de levedura (3,5% (m/m), temperatura de 30 °C e umidade de 40% aumentaram 8,4 vezes a produção da enzima. A lipase produzida apresentou elevada atividade em pH 5,0, a 50 °C e estabilidade em uma ampla faixa de pH e termoestabilidade nas temperaturas de 45 e 50 °C após 24 h. Outros estudos ainda devem ser realizados para melhor explorar esta técnica de cultivo em escalas piloto, identificando e explorando o uso desta lipase em processos que requerem condições moderadas de aplicação.

Palavras-chave: *Candida viswanathii*, lipase, gordura de frango, farelo de trigo, bagaço de cevada, caracterização bioquímica

INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol acil hidrolase, E.C. 3.1.1.3) pertencem ao grupo das serina hidrolases cuja principal função biológica é catalisar a hidrólise das ligações ésteres de óleos e gorduras com subsequente liberação de ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos e glicerol. Estas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e micro-organismos e podem ser obtidas a partir de tecidos animais e vegetais ou por meio de cultivos microbianos (KAPOOR e GUPTA, 2012).

Recentemente, as lipases tem assumido um proeminente lugar no mercado mundial de enzimas evidenciado pelo aumento de informações relatadas na literatura (RIGO et al., 2010). Após as proteases e amilases, as lipases são consideradas o terceiro maior grupo de enzimas, que movimentam milhões de dólares anuais nesse mercado, devido, principalmente, à sua gama de aplicações, o que as tornam bastante atrativas em aplicações industriais (CONTESINI e CARVALHO, 2006; HASAN et al., 2010; RIGO et al., 2010).

O potencial de aplicação de lipases compreende as indústrias de aditivos (modificação de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de águas residuárias (decomposição e remoção de substâncias oleosas), farmacêutica e também a área médica (BURKERT et al., 2004). As lipases com alta atividade e estabilidade em pH abaixo da neutralidade, chamadas lipases ácidas, apresentam importantes aplicações industriais como na síntese de ésteres, como por exemplo, o acetato de isoamila (formados em ambiente ácido), utilizadas como auxiliar na digestão gástrica, em substituição às lipases pancreáticas (HASAN et al., 2010; RAMANI et al., 2010). Ainda em relação a estes aspectos, estudos baseados na utilização de diferentes micro-organismos, suplementos e substratos para a produção de lipases podem contribuir na descoberta de combinações ideais para a obtenção destas enzimas utilizando substratos e condições operacionais que facilitam a redução dos custos de operação em escala industrial (RIGO et al., 2010).

Neste sentido, a fermentação em substrato sólido (FSS) é uma interessante alternativa para a produção de enzimas microbianas devido à possibilidade de usar resíduos agroindustriais e/ou subprodutos como fonte de nutrientes ou como suporte para o crescimento microbiano. A seleção do substrato apropriado é uma etapa chave para a FSS (EDWINOLIVER et al., 2010) e, recentemente, farelo de trigo (DAMASO et al., 2008); bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUEZ et al., 2006; BABU e RAO, 2007); torta da extração de óleos vegetais (RAMACHANDRAM et al., 2007) foram avaliados na composição de

meios de cultivo para a produção de lipases. Substratos de origens agroindustriais atuam como suporte físico, fonte de nutrientes e, em alguns casos fornecem indutores para a produção de enzimas (EDWINOLIVER et al., 2010).

A baixa umidade utilizada no meio de cultivo permite que a fermentação seja realizada por um número limitado de micro-organismos, principalmente leveduras e fungos, embora algumas bactérias também tenham sido utilizadas para este fim (PANDEY et al., 2000). Ainda que este processo apresente algumas limitações em relação ao controle de temperatura, aeração, pH e umidade (BELLON-MARUEL et al., 2003), a FSS possui vantagens sobre a fermentação submersa como maior produtividade, menor requerimento de energia, maior recuperação do produto, baixa quantidade de efluentes (COUTO e SANROMÁN, 2006; IMANDI et al., 2010). Durante o processo de FSS, tem-se grande dificuldade em suprir todas as necessidades nutricionais requeridas pelo micro-organismo, e isto poderia ser obtido empregando-se uma combinação de diferentes substratos. Assim, Edwinoliver et al. (2010) desenvolveram um substrato misto, preparado pela combinação de farelo de trigo, trigo bruto e torta de óleo de coco, aumentando o crescimento do micro-organismo e a produção de lipase por *Aspergillus niger*. Neste capítulo, os objetivos foram selecionar um substrato apropriado para a produção de lipase, bem como, selecionar passo-a-passo vários fatores nutricionais e ambientais que influenciam a produção desta enzima por *C. viswanathii*. Além disso, a enzima foi caracterizada quanto a sua atividade e estabilidade em diferentes pHs e temperaturas.

MATERIAL E MÉTODOS

Substratos, suplementos e reagentes

Farelo de trigo, farinha de soja, proteína de soja, sebo bovino e óleos vegetais foram adquiridos no mercado local. Bagaço de cevada foi obtido na Cervejaria Baumgartner, Ipeúna-SP. Gordura de frango foi fornecida pela Fricok Frigorífico S/A, Rio Claro-SP. Casca de mandioca foi obtida na CornProducts Brasil, Conchal-SP. Água de maceração de milho (milhocina) foi adquirida da CornProducts Brasil, Mogi Guaçu-SP. Bagaço de cana-de-açúcar, polpa cítrica, proteína de algodão, soro de leite, e banha suína foram adquiridos de

agro-indústria da região de Rio Claro, SP. Os demais reagentes e suplementos utilizados nos experimentos foram de grau analítico.

Preparo do Inóculo

A linhagem de *Candida viswanathii* está disponível na coleção de culturas do Centro de Estudos Ambientais – CEA, UNESP, Rio Claro-SP. A linhagem foi cultivada em meio ágar extrato de malte por três dias, a 28 °C para o preparo do inóculo. O pré-inóculo foi preparado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio líquido de Vogel modificado (VOGEL, 1956) suplementado com 1,5% (m/v) de azeite de oliva e 0,2% (m/v) de extrato de levedura, pH 6,0. O meio de cultivo foi inoculado com 1 mL de uma suspensão de células (10^7 células/mL) e mantido sob agitação de 210 rpm, a 28 °C por 24 horas. Cinco mililitros deste pré-inóculo foram inoculados nos substratos utilizados para a fermentação em substrato sólido.

Preparo dos substratos sólidos

Os cultivos foram preparados em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 10 g dos substratos: farelo de trigo, casca de mandioca, bagaço de cevada, polpa cítrica ou bagaço de cana-de-açúcar com granulometria de $-2,0$ e $>1,0$ mm. Bagaço de cevada e casca de arroz foram adicionados ao farelo de trigo, em diferentes proporções, para promover melhor aproveitamento do mesmo durante o crescimento microbiano. Aos substratos foram adicionados 10 mL de uma solução de sais sem nitrogênio (VOGEL, 1956) para fornecer umidade inicial de 50%. Em uma segunda etapa, cultivos contendo azeite de oliva (25%, m/v) foram avaliados para a produção de lipase. Os meios de cultivo foram autoclavados a 121 °C, por 20 min.

Extração das enzimas

Após o cultivo, a enzima foi extraída adicionando-se 100 mL de água destilada gelada, sob agitação orbital de 250 rpm, 4 °C, por 60 min. A separação dos sólidos foi realizada por filtração a vácuo e o sobrenadante foi centrifugado a 8000g por 20 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade lipase e de proteínas.

Condições de cultivo

Após as etapas de seleção do substrato, adição de outras fontes de carbono e de nitrogênio, seleção da temperatura e umidade para a produção de lipase, as condições foram individualmente avaliadas por um processo de otimização passo-a-passo. Todos os cultivos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados com seus respectivos valores médios.

Suplementação com fontes de carbono

Os substratos foram suplementados com diferentes triacilgliceróis (TAG) na concentração inicial de 25% (m/m): azeite de oliva, óleo de dendê, óleo de soja, óleo de milho, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de linhaça, óleo de babaçu, gordura de frango, sebo bovino, banha suína e óleo de fritura. Após esta etapa de cultivo, a melhor fonte indutora foi avaliada nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50% (m/m).

Suplementação com fontes de nitrogênio

Os substratos foram suplementados com a adição de diferentes fontes de nitrogênio na concentração inicial de 5% (m/m): água de maceração de milho, extrato de levedura, proteína de soja, soro de leite em pó, proteína de algodão (Proflo[®]), nitrato de amônio e sulfato de amônio. A fonte de nitrogênio selecionada foi avaliada nas concentrações de 1,0 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5% (m/m).

Efeito da temperatura e umidade do substrato sobre a produção de lipase

O efeito da temperatura de incubação sobre a produção de lipase foi verificado realizando-se cultivos a 15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. A umidade inicial do meio de cultivo foi avaliada adicionando-se sais de Vogel (VOGEL, 1956) a fim de se estabelecer umidade inicial de 20, 30, 40, 50, 60 e 70% (v/m). Os cultivos foram realizados utilizando-se as condições anteriormente estabelecidas.

Determinação da atividade enzimática

A atividade da lipase foi determinada com *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato. O pNPP foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfoxido (DMSO) e então diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 3,5 contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do *p*-nitrofenol. Após pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL da amostra devidamente diluída. A reação foi interrompida em diferentes intervalos com choque térmico (90 °C, 1 min), seguido da adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm [coeficiente de extinção molar para *p*-nitrofenol (pNP): $1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Controles foram preparados sem a adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por min por mL. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Determinação de proteínas

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

Propriedades da enzima

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade

Para determinação do pH ótimo de atividade da enzima, os ensaios foram realizados em tampão glicina-HCl 0,05 M para a faixa de pH 2,0 – 3,0, tampão McIlvaine para os pH de 3,0 – 8,0 e tampão Tris-HCl 0,05 M 8,0 – 9,0. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para a diluição das amostras. A atividade foi determinada a 40 °C, conforme descrito anteriormente.

A temperatura ótima de atividade da enzima foi determinada nas temperaturas de 20 a 60 °C, com intervalos de 5 °C, em tampão McIlvaine pH 5,0. A enzima foi convenientemente diluída no mesmo tampão e a atividade determinada como anteriormente descrito.

Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da enzima

Para determinação da estabilidade em diferentes valores de pH, incubou-se alíquotas da enzima em diferentes tampões, na proporção 1:2 (v/v), que compuseram a faixa de pH de 2,0 a 10,0. O procedimento foi realizado a 10 °C, e, após 24 h, determinou-se a atividade enzimática residual. O controle das reações foi realizado determinando-se a atividade enzimática imediatamente após a adição da amostra aos respectivos tampões. A dosagem da atividade lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 5,0 a 50 °C.

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pela incubação das amostras em diferentes temperaturas na ausência do substrato, sendo que a enzima incubada a 45, 50, 55 e 60 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo variados, transferidas para banho de gelo, e então utilizadas para a determinação da atividade residual, que foi ensaiada nas condições anteriormente citadas. A partir dos resultados obtidos, estimou-se o valor de T_{50} .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção de substratos para produção de lipase

A linhagem de *C. viswanathii* foi anteriormente selecionada para a produção de lipase em cultivos submersos. A determinação de algumas propriedades bioquímicas da lipase produzida por esta linhagem revelou que se tratava de uma nova lipase para o gênero *Candida*, cuja atividade ótima foi encontrada em condições ácidas (pH 3,5 – 4,5) (**Capítulo 3**). Uma alternativa viável para a produção desta enzima seria a FSS, uma vez que os substratos utilizados nestas fermentações são de baixo valor agregado ou comercial. Dessa forma, cultivos em diferentes substratos como farelo de trigo (FT), casca de mandioca, bagaço de cevada (BC), bagaço de cana-de-açúcar e polpa cítrica foram inicialmente realizados sem ou com a adição de azeite de oliva (**Tabela 1**). A maior produção de lipase foi observada em farelo de trigo suplementado com azeite de oliva (5.79 ± 0.87 U/gss). Bagaço de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca e polpa cítrica não foram eficientes para a produção de lipase em ambos os substratos suplementados ou não com azeite de oliva. O farelo de trigo é um substrato eficiente na produção de enzimas devido à sua concentração de proteínas, dissipação de calor, melhor circulação de ar, penetração do micélio nas partículas do substrato (JAVED et al., 2012).

A mistura de substratos sólidos, em geral, pode ser considerada uma prática viável e pode promover um efeito sinérgico durante a fermentação em substratos sólidos (BENJAMIN e PANDEY, 1998; MALA et al., 2007). Assim sendo, o FT foi combinado com diferentes proporções de BC ou casca de arroz (CA) (**Tabela 1**). A maior produção de lipase (18,65 U/gss) e atividade específica (8,85 U/mg de proteína) foi obtida com a combinação de FT+BC (1:1), suplementados com 25% de azeite de oliva. O valor de atividade obtido foi 3,2 vezes maior quando comparado com aquele obtido com farelo de trigo suplementado com azeite de oliva. Quanto à adição de casca de arroz ao farelo de trigo, a maior produção de lipase foi observada na combinação FT+CA (3:2), a qual apresentou atividade lipase de 14,32 U/gss e atividade específica de 6,35 U/mg de proteína. Os resultados também apontaram que em outras combinações destes substratos houve aumento da produção da enzima quando comparado aos resultados utilizando-se os substratos individualmente. O aumento da produção poderia estar relacionado com um aumento da superfície de contato e melhor distribuição espacial durante a colonização do substrato pela levedura.

Tabela 1. Produção de lipase ácida por *C. viswanathii* em substratos sólidos.

Substratos	Sem azeite de oliva		Com azeite de oliva	
	Atividade	Atividade	Atividade	Atividade
	Lipase	Específica	Lipase	Específica
	(U/gss)	(U/mg prot)	(U/gss)	(U/mg prot)
Farelo de trigo	0.94±0.10	0.03±0.00	5.79±0.87	3.50±0.20
Bagaço de cevada	0.40±0.01	0.04±0.00	0.32±0.04	0.37±0.00
Casca mandioca	ND	ND	0.17±0.01	1.25±0.10
Bagaço cana	0.10±0.01	0.95±0.00	0.12±0.01	1.04±0.10
Polpa cítrica	0.11±0.02	0.01±0.00	0.30±0.04	0.11±0.00
FT+BC (3:1)	0.67±0.03	0.20±0.00	15.82±1.17	6.72±0.70
FT+BC (3:2)	0.88±0.07	0.28±0.00	17.46±1.16	7.94±0.91
FT+BC (1:1)	0.62±0.02	0.33±0.00	18.65±1.77	8.85±0.83
FT+CA (3:1)	0.20±0.02	0.04±0.00	9.25±0.90	2.11±0.11
FT+CA (3:2)	0.45±0.03	0.17±0.00	14.32±0.78	6.35±0.52
FT+CA (1:1)	0.45±0.03	0.18±0.00	10.10±0.55	5.65±0.43

Cultivos foram realizados por 120 horas, a 28 °C. O inóculo foi preparado em fermentação submersa por 24 horas, 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% de solução de sais de Vogel sem fonte de nitrogênio e 25% de azeite de oliva FT: farelo de trigo, BC: bagaço de cevada, CA casca de arroz.

O aumento da produção de lipases utilizando substratos mistos também foi verificado por outros trabalhos. Benjamin e Pandey (1998) observaram que a linhagem *Candida rugosa*

apresentou maior rendimento na produção de lipase utilizando-se uma mistura farelo de trigo fino, farelo de trigo grosso e torta de coco. Os autores observaram que a produção de lipase e o crescimento microbiano foram fatores independentes e a maior produção de enzima foi observada na fase estacionária de crescimento. A produção de lipase por *Aspergillus niger* foi aumentada em 36% usando como substrato farelo de trigo e torta de gergelim (MALA et al., 2007). Edwinoliver et al. (2010) desenvolveram um substrato contendo farelo de trigo, farelo de trigo cru e torta de gergelim para a produção de lipase por *A. niger*, resultando em aumento no rendimento quando comparado com resultados dos ensaios que utilizaram substrato individualmente. Os autores atribuíram a estes resultados um efeito sinérgico entre os três substratos, sendo que o farelo de trigo apresentou função bastante importante para a produção de lipase.

A cinética de produção de lipase por *C. viswanathii* foi avaliada durante 10 dias realizando-se em cultivos com FT e BC (1:1) umidade inicial de 50%, suplementado com 25% de azeite de oliva (**Figura 1**). A produção de lipase iniciou-se após 24 h de cultivo atingindo a produção máxima de 18,36 U/gss após 120 h, seguido então de um decréscimo da produção. A maior atividade específica (10,20 U/mg de proteína) foi observada após 168 h de cultivo. Embora o crescimento celular não tenha sido analisado durante o experimento, a produção de lipase de *C. viswanathii* está associada ao crescimento microbiano, como observado durante os cultivos submersos (**Capítulos 1 e 2**). Em outros trabalhos, produção de lipase associada ao crescimento microbiano também foi verificada em fermentação sólida utilizando fungos filamentosos (KAMINI et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2006; EDWINOLIVER et al., 2010).

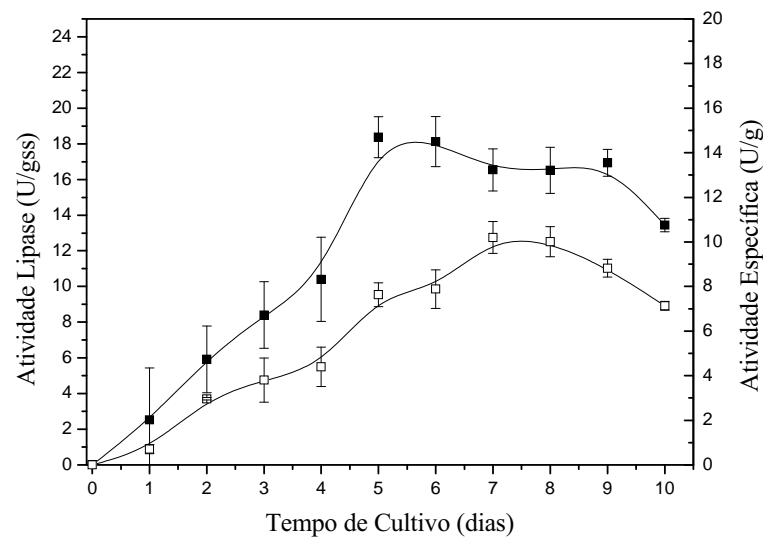


Figura 1. Cinética da produção de lipase por *Candida viswanathii* em fermentação em substrato sólido com farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1). (■) atividade lipase; (□) atividade específica. Os cultivos foram realizados por 10 dias, 28 °C. O inóculo foi preparado em fermentação submersa por 24 horas, 28 °C, umidade inicial 50% com solução de sais de Vogel sem fonte de nitrogênio e 25% de azeite de oliva.

Efeito de TAG sobre a produção de lipase

TAG são importantes fontes renováveis e de baixo custo comercial geralmente utilizado para a indução de lipases em meios líquidos e sólidos. Vários TAG como azeite de oliva, azeite de dendê, óleo bruto de babaçu, óleo bruto de linhaça, óleo de canola, óleo de girassol, óleo de milho, óleo de soja, gordura de frango, banha suína, sebo bovino e óleo de fritura foram utilizados para suplementar o substrato FT+BC (1:1). A linhagem *C. viswanathii* produziu elevados níveis de lipase com todos os substratos avaliados (**Figura 2**), sendo que a maior produção (24,20 U/gss) foi observada com gordura de frango, seguida por óleo de soja (20,50 U/gss) e óleo de girassol (19,43 U/gss). A maior atividade específica (26,00 U/mg de proteína) foi verificada com óleo de soja.

Alguns estudos desenvolvidos com fermentação submersa ajudam a compreender o mecanismo de indução de lipase por micro-organismos quando cultivados com diferentes ácidos graxos puros ou TAG de origem vegetal, sendo esta induzida principalmente por

ácidos graxos monoinsaturados de cadeia longa, como o ácido oleico (LAKSHMI et al., 1999; SHARMA et al., 2001; GULATI et al., 2005; POGORI et al., 2008; TREICHEL et al., 2010).

A gordura de frango é um subproduto da indústria frigorífica com pouco valor agregado e utilização industrial, não havendo competição com outras fontes destinadas à nutrição humana (CENTENARO et al., 2008). Além disso, ela apresenta alta quantidade de ácidos graxos insaturados em sua composição, sendo que o ácido oleico responde por aproximadamente 50% dos ácidos graxos presentes (LEE e FOGLIA, 2000; CHIU et al., 2007). Sendo assim, a concentração desse ácido graxo pode justificar a maior produção de lipase por *C. viswanathii* nos cultivos com este subproduto.

Outro fator importante observado é o favorecimento da FSS com a utilização de gordura de frango que pode ser empregada na produção de lipase em substituição ao azeite de oliva. Entretanto, a gordura de frango apresenta-se semi-sólida em temperatura ambiente o que pode causar problemas durante a fermentação submersa, como a formação de agregados sólidos, impedindo sua utilização pelo micro-organismo e, por consequência, a produção de lipase.

Níveis intermediários de produção de lipase (13,10 – 17,00 U/gss) foram observados com azeite de dendê, azeite de oliva, óleo de canola, sebo bovino e óleo bruto de babaçu, enquanto que os cultivos com óleo de milho, óleo bruto de linhaça, óleo de fritura e banha suína, resultaram em menores produções da enzima (10,55 – 13,68 U/gss). Estes resultados sugerem, entretanto, que estas fontes de carbono poderiam ser utilizadas por *C. viswanathii* em outros processos fermentativos como fontes alternativas e de baixo custo para a produção de lipase.

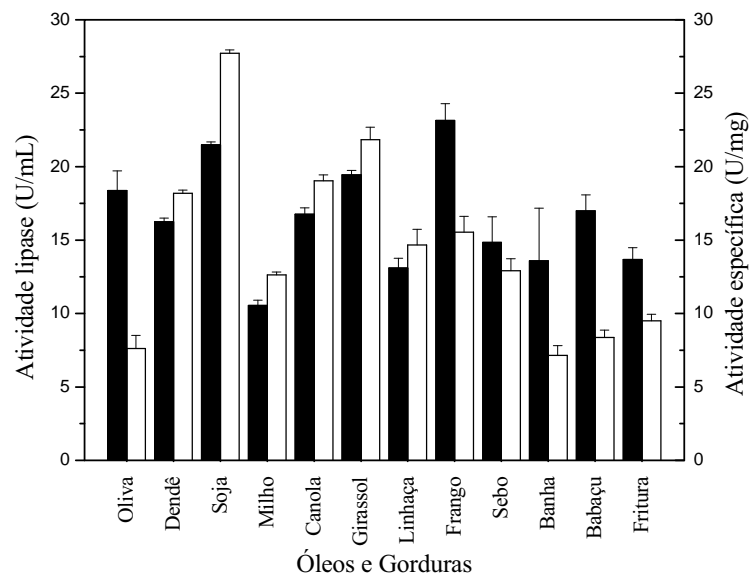


Figura 2. Efeito de diferentes triacilgliceróis utilizados para a produção de lipase por *C. viswanathii*. (■) atividade lipase; (□) atividade específica. Os cultivos foram realizados com farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1) por 5 dias, a 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% (m/v) de solução de sais Vogel sem fonte de nitrogênio e 25% de diferentes triacilgliceróis.

Mahadik et al. (2002) observaram maior produção de lipase por *A. niger* NCIM 1207 utilizando óleo de sésamo seguido de azeite de oliva. Rodriguez et al. (2006) observaram que o uso de óleo milho, óleo de amêndoa, óleo de amendoim, óleo de semente de uva, óleo de girassol e azeite de oliva para suplementar o bagaço de cana-de-açúcar induziram a produção de altas taxas de lipase por *Rhizopus homothallicus*. Papanikolaou et al. (2007) utilizaram um derivado industrial de sebo bovino para a produção de lipídio microbiano, proteína unicelular e lipase por *Yarrowia lipolytica*. A produção de lipase por *Pseudomonas gessardii* foi otimizada com o uso de sebo de cabra (RAMANI et al., 2010).

Na **Figura 3** são apresentados os resultados da produção de lipase utilizando-se diferentes concentrações de gordura de frango. Ao contrário do que se esperava com relação à concentração de TAG no substrato, a maior produção de lipase (31,43 U/gss) foi observada na concentração de 40% (m/m) de gordura de frango, enquanto que acima desta concentração, ocorreu um decréscimo na produção enzimática. Em outros trabalhos, também foi verificada que a utilização de altas concentrações de TAG presentes em meios de cultivo líquidos ou

sólidos causou redução na produção de lipases devido a um possível efeito tóxico aos microorganismos acarretado pela liberação dos ácidos graxos e glicerol (BURKERT et al., 2004; GULATI et al., 2005; GUTARRA et al., 2005; TENG et al., 2009). Assim, a alta concentração inicial de indutor utilizada para a produção de lipase por *C. viswanathii*, entretanto, pode estar relacionada a uma maior superfície de contato entre o substrato e as células microbianas.

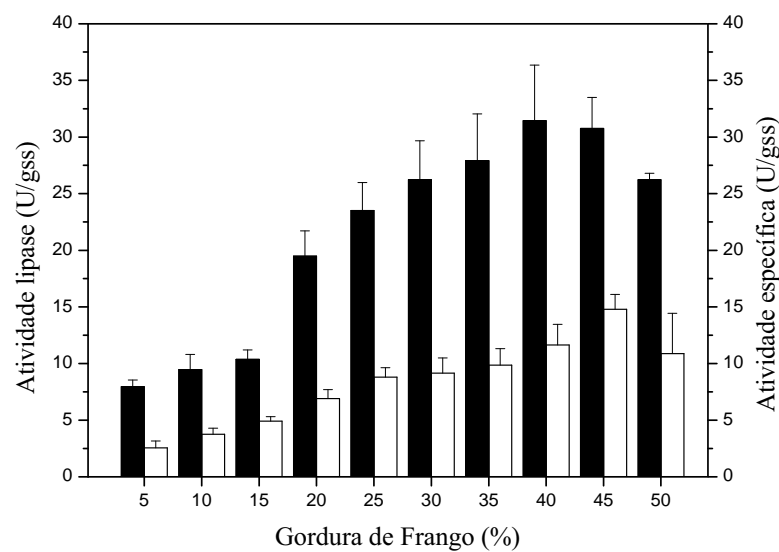


Figura 3. Efeito das concentrações de gordura de frango na produção de lipase por *C. viswanathii*. (■) atividade lipase; (□) atividade específica. Os cultivos foram realizados com farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1) por 5 dias, a 28 °C. Os substratos foram suplementados com 50% (m/v) de solução de sais Vogel sem fonte de nitrogênio.

Efeito de fontes de nitrogênio sobre a produção de lipase

Fontes de nitrogênio, orgânica ou inorgânica, desempenham importante função sobre o metabolismo dos organismos e, conseqüentemente, na produção de enzimas (TAN et al.,

2004). Diversas fontes de nitrogênio, orgânica ou inorgânica, foram avaliadas na produção de lipase por *C. viswanathii*. Os resultados apresentados na **Tabela 2** indicam que dentre as fontes de nitrogênio inorgânicas houve inibição da produção de lipase, sendo que o nitrato de amônio o único capaz de induzir uma pequena produção de lipase. Em relação às fontes orgânicas, todas promoveram o aumento da produção de enzima acima do encontrado sem a adição das mesmas. Especialmente, a suplementação com 5% (m/m) de extrato de levedura resultou em maior aumento na produção (119,91 U/gss), contribuindo para o aumento de 3,8 vezes na produção da enzima, quando comparado ao cultivo sem a adição da mesma.

Tabela 2. Fontes de nitrogênio utilizadas para a produção de lipase por *C. viswanathii*.

Fontes de nitrogênio	Atividade lipase	Atividade Específica
(5,0%, m/m)	(U/gss)	(U/mg prot.)
Controle	31,43 ± 4,91	11,64 ± 1,81
Extrato de levedura	119,91 ± 11,68	65,50 ± 6,38
Milhocina	57,96 ± 5,20	49,32 ± 5,35
Soro de leite	61,00 ± 4,20	93,53 ± 6,44
Farinha de soja	40,65 ± 4,80	24,12 ± 4,03
Proteína de soja	84,60 ± 4,41	76,22 ± 7,62
Proteína de algodão	57,95 ± 2,83	66,84 ± 3,72
NH ₄ NO ₃	4,80 ± 0,64	7,44 ± 1,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	N.D.	N.D.

Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, por 5 dias, a 28 °C. N.D. nenhuma atividade lipase foi observada nas condições de análise. Controle: cultivos realizados sem a adição de fontes de nitrogênio.

O emprego da proteína de soja resultou na segunda maior produção de lipase (84,60 U/gss), seguida por soro de leite, milhocina, proteína de algodão e farinha de soja. A maior atividade específica (93,53 U/mg de proteína) foi verificada com soro de leite, seguido por proteína de soja (76,22 U/mg de proteína). O emprego de extrato de levedura também aumentou a produção de lipase por muitos outros micro-organismos (GUPTA et al., 2007; KUMAR e GUPTA, 2008; RUCHI et al., 2008). O uso de fontes de nitrogênio como peptona (MAHANTA et al., 2008), milhocina (EDWINOLIVER et al., 2009) e ureia (RODRIGUEZ et al., 2006) também mostraram-se efetivas para a produção de lipase extracelular em outros processos.

Na **Figura 4** são apresentados os resultados do efeito da adição de diferentes concentrações de extrato de levedura sobre a produção de lipase por *C. viswanathii*. A produção de lipase aumentou com o aumento da concentração desta fonte de nitrogênio, atingindo a maior atividade (143,60 U/gss) com 3,5% (m/m) de extrato de levedura, cuja atividade específica foi de 52,85 U/mg de proteína. Em outras concentrações desta fonte de nitrogênio ocorreram decréscimos na produção de lipase. Na literatura tem sido observada que a alta concentração de fontes de nitrogênio no meio de cultivo é efetiva para aumentar a produção de lipase por micro-organismos (OHNISHI et al., 1994; MAHANTA et al., 2008; SUN e XU, 2008). A produção máxima de lipase por *C. rugosa* (BENJAMIN e PANDEY, 1997) e *Y. lipolytica* (IMANDI et al., 2010; HOSSEINPOUR et al., 2011) foi obtida utilizando-se 1,0 – 2,0% (m/m) de ureia nos cultivos com torta de extração de óleos vegetais.

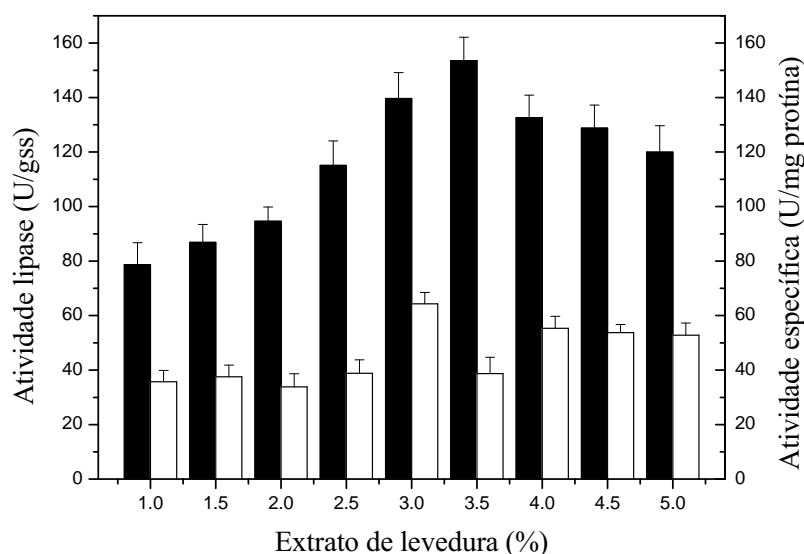


Figura 4. Efeito da concentração de extrato de levedura sobre a produção de lipase e atividade específica por *C. viswanathii*. (■) atividade lipase; (□) atividade específica. Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, umidade 50%, por 5 dias, a 28 °C.

Efeito da temperatura sobre a produção de lipase

A produção de lipase é criticamente influenciada pela temperatura de cultivo. Na **Tabela 3** estão apresentados os resultados obtidos para a produção de lipase e atividade específica nos cultivos realizados entre 15 e 40 °C. O aumento da temperatura favoreceu a produção de lipase por este micro-organismo sendo a maior produção (143,36 U/gss) bem como a maior atividade específica (65,76 U/mg de proteína) observadas a 30 °C. O aumento da temperatura de 15 para 30 °C promoveu um acréscimo na produção de lipase de aproximadamente 5,5 vezes. Acima desta temperatura houve uma redução da produção de enzima, sendo observado valores de 129,11 U/gss a 35 °C, e a 40 °C a atividade lipolítica reduziu para 25,80 U/gss.

Tabela 3. Efeito da temperatura sobre a produção de lipase e atividade específica de *C. viswanathii*.

Temperatura (°C)	Atividade lipase (U/gss)	Atividade específica (U/mg proteína)
15	26,10 ± 4,42	13,31 ± 1,92
20	56,05 ± 6,07	22,97 ± 2,43
25	77,71 ± 3,36	28,59 ± 2,71
30	143,36 ± 9,65	65,76 ± 3,18
35	129,11 ± 8,15	43,19 ± 2,98
40	25,80 ± 6,17	10,05 ± 1,56

Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, 3,5% (m/m) de extrato de levedura, umidade 50%, por 5 dias.

Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes aos observados para a produção de lipase por *C. viswanathii* em fermentação submersa, sendo que a maior produção da enzima foi observada entre 27,5 e 30,0 °C (**Capítulo 2**). O monitoramento do controle de temperatura em FSS ainda apresenta uma série de dificuldades em um contexto industrial (BELLON-MAUREL et al., 2003). Estes efeitos, entretanto, podem não ser visíveis em cultivos realizados em frascos contendo poucas gramas de substrato. A mistura de substratos como o bagaço de cevada, além de apresentar um efeito sinérgico na produção de lipase, poderia ainda ter evitado a formação de uma massa compactada o que ajudaria na respiração microbiana e na dissipação do calor gerado durante o crescimento microbiano (PANDEY et al., 2000; RAHARDJO et al., 2005). Em outros trabalhos, a adição de bagaço de cevada a outros substratos de origem agroindustrial ajudou na remoção do calor gerado durante o cultivo o que pode ter influenciado no aumento da acumulação do produto ao substrato fermentado (CERTIK et al., 2006).

Efeito da umidade do meio de cultivo sobre a produção de lipase

A umidade do meio de cultivo também apresenta extrema importância para o crescimento microbiano e produção de enzimas em FSS (SALIHU et al., 2012). Para avaliar a influência da umidade do substrato sobre a produção de lipase por *C. viswanathii*, o substrato FT+BC (1:1) foi umedecido com solução de sais de Vogel (VOGEL, 1956) com o objetivo de alcançar 20, 30, 40, 50, 60 e 70% de umidade inicial. Os resultados apresentados na **Figura 5** mostram que 40% de umidade inicial no meio de cultivo foi ideal para a produção de lipase (157,33 U/gss), na qual também foi observada a maior atividade específica (136,20 U/mg de proteína). Cultivos com umidades de 30% ou 50% resultaram em produção de lipase de 147,55 e 143,36 U/gss, respectivamente. Um aumento ou decréscimo na umidade inicial do meio além destas, resultaram em decréscimo na produção da enzima.

O nível de umidade em FSS tem um grande impacto sobre as propriedades físicas do substrato. Um aumento no teor de umidade pode provocar diminuição na porosidade do substrato, diminuindo assim a troca gasosa. Um teor de umidade baixo conduz a um baixo crescimento microbiano e menor grau de expansão do substrato que também diminui a produção de enzima (MAHADIK et al., 2002; PANDEY, 2003; MAHANTA et al., 2008). Benjamin e Pandey (1997) avaliaram a produção de lipase por *Candida rugosa* em FSS utilizando 70% de umidade inicial. Outras linhagens de levedura (IMANDI et al., 2010) e fungos filamentosos (GUTARRA et al., 2005; SUN e XU, et al., 2008) também apresentaram maior produção de lipase com 70% de umidade inicial dos substratos. Kempka et al. (2008) obtiveram maior produção lipase por *Penicillium verrucosum* utilizando 55% de umidade inicial no meio de cultivo.

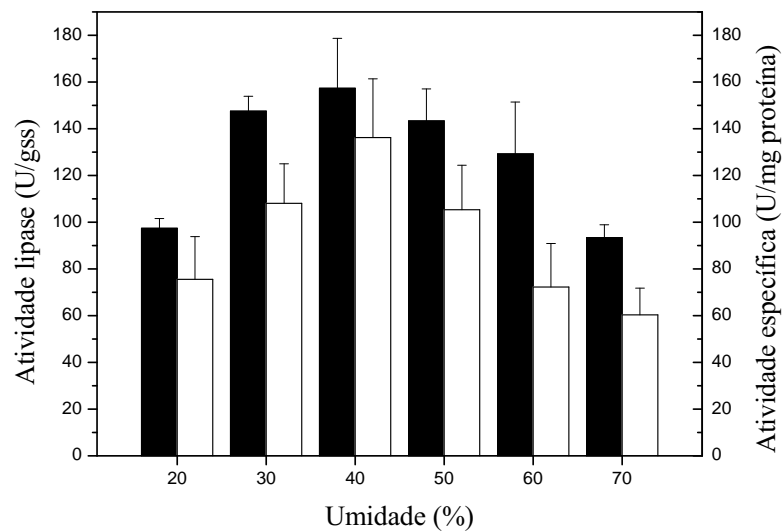


Figura 5. Efeito da umidade do meio de cultivo sobre a produção de lipase e atividade específica de *C. viswanathii*. Cultivos foram realizados em meio farelo de trigo + bagaço de cevada (1:1), 40% (m/m) de gordura de frango, 3,5% (m/m) de extrato de levedura, umidade 50%, por 5 dias, a 30 °C.

Caracterização bioquímica da lipase produzida

Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade da lipase

O efeito do pH sobre a atividade da lipase foi determinada dosando-se a atividade na faixa de pH entre 2,0 e 9,0 na temperatura de 40 °C (**Figura 6A**). A lipase apresentou atividade elevada na faixa de pH entre 4,5 e 6,0, sendo que a atividade ótima foi verificada nos pH 5,0 e 5,5. Entre pH 2,0 e 3,5, bem como entre 6,0 e 9,0 a atividade diminuiu para níveis inferiores, apresentando apenas 17,6% da atividade em pH 9,0.

Quanto ao efeito da temperatura sobre a atividade da lipase, os melhores resultados foram observados entre 45 e 55 °C, sendo a atividade ótima observada a 50 °C. Abaixo de 35 °C, como também acima de 60 °C, a atividade diminuiu para níveis inferiores a 50%, sendo que a 70 °C a atividade foi apenas 4,8% da máxima observada.

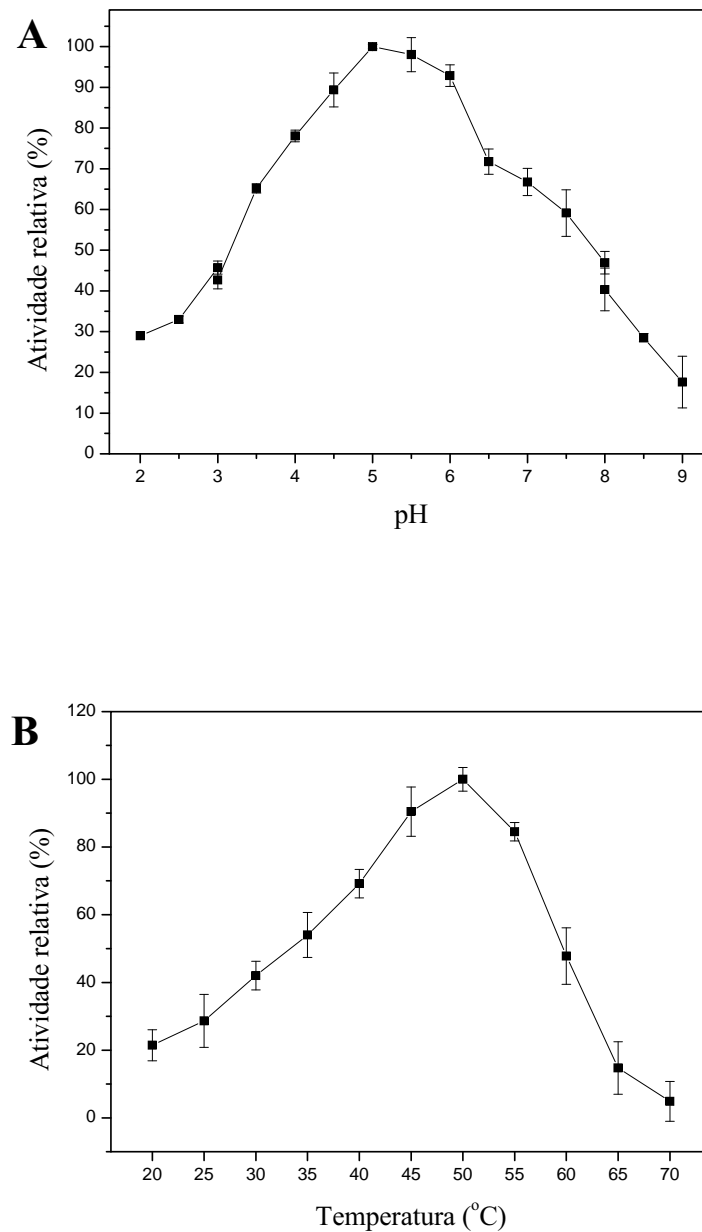


Figura 6. Efeito do pH (**A**) e da temperatura (**B**) sobre a atividade da lipase ácida produzida por *C. viswanathii* em fermentação em substrato sólido. Condições de ensaio: em (**A**), atividade enzimática realizada nos tampões: pH 2,0 – 3,0 tampão glicina HCl 0,05 M, pH 3,0 – 8,0 tampão McIlvaine, pH 8,0 – 9,0 tampão Tris-HCl 0,05 M, a 40 °C; em (**B**), as atividades foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0.

Para critério de discussão, a lipase produzida por fermentação submersa, apresentou atividade ótima em pH 3,5 e a 40 °C (**Capítulo 2**). Da mesma maneira que a lipase de *C. viswanathii*, a lipase de *Rhizopus homothallicus* produzida por FSS apresentou temperatura ótima de atividade maior que a produzida por fermentação submersa (MATEOS DIAZ et al., 2006). Os autores atribuíram a esses resultados o fato de que alguns compostos não protéicos do meio poderiam estar não-covalentemente associados com uma ou ambas as formas da lipase produzida, afetando assim suas propriedades físico-químicas.

Efeito do pH e da temperatura sobre a estabilidade da lipase

Para verificação da estabilidade ao pH, incubou-se a enzima em tampões de diferentes pH, por um período de 24 h, a 10 °C. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 7A**, a lipase manteve aproximadamente 100% de sua atividade em uma ampla faixa de pH entre 3,0 e 8,0 e reteve acima de 60% nos pH 2,0 e 2,5, bem como em 8,5 e 9,0. Entretanto, no pH 9,5 a atividade residual foi de 32,0% e, em pH 10,0, a enzima perdeu completamente sua atividade. Os resultados obtidos são semelhantes àqueles observados por Mahadik et al. (2002) que relataram que a lipase produzida por *A. niger* NCIM 1207 reteve aproximadamente 70,0% da atividade em pH 2,0 e 50,0% em pH 9,0 após 24 h de incubação em temperatura ambiente.

A estabilidade térmica das lipases é um aspecto muito importante nos processos enzimáticos, uma vez que sua instabilidade, em processos industriais, impossibilita sua aplicação por problemas de inativação térmica. Muitas lipases produzidas por fungos mesofílicos apresentaram baixa estabilidade térmica após 1 h de incubação, sendo instáveis em temperaturas acima de 40 °C (GUTARRA et al., 2009). Para a avaliação da termoestabilidade da lipase, a enzima foi incubada na ausência de substrato em meio tamponado em diferentes temperaturas. O aumento da temperatura levou à diminuição do tempo necessário para que ocorresse desnaturação e consequente perda de atividade. Em contraste, a lipase reteve 97,0% da atividade após 24 h a 45 °C. Os valores estimados de meia-vida a 50, 55 e 60 °C foram, respectivamente, 23,5, 1,66 e 0,25 h (**Figura 7B**).

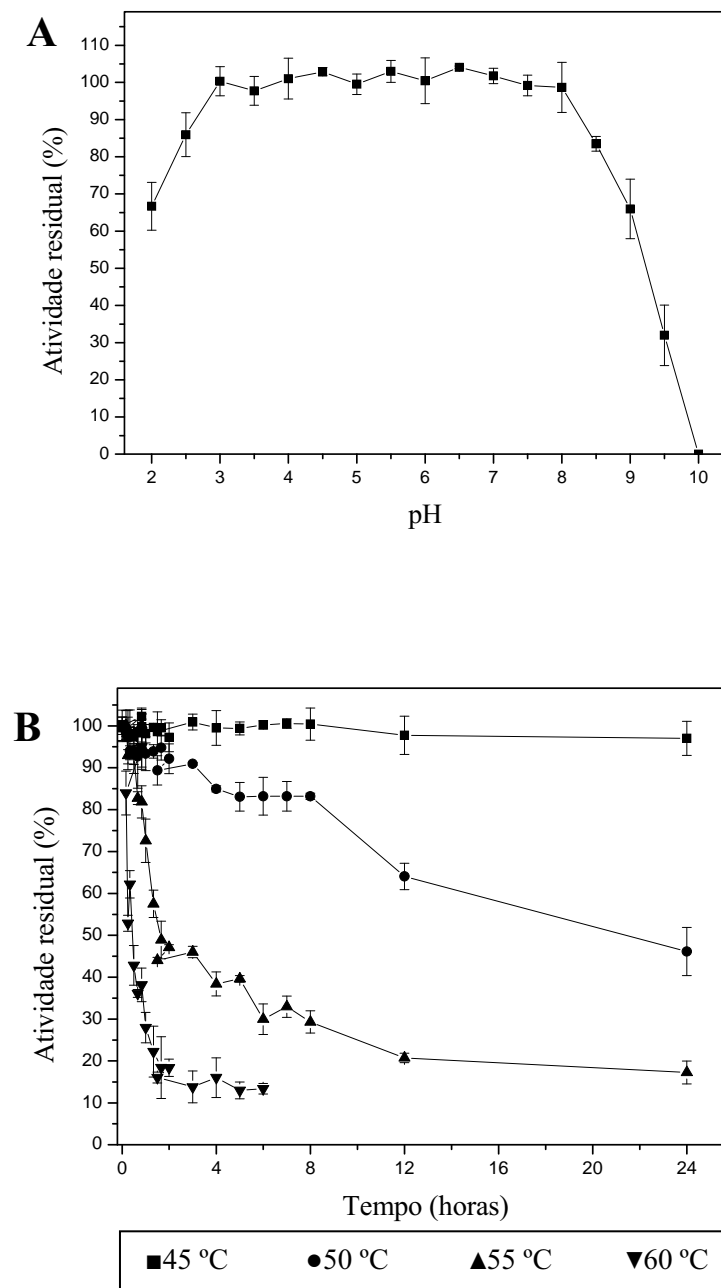


Figura 7. Efeito do pH (**A**) e da temperatura (**B**) sobre a estabilidade da lipase ácida produzida por *C. viswanathii* em fermentação em substrato sólido. Condições de ensaio: em (**A**), pH 2,0 – 2,5 tampão glicina HCl 0,05 M, pH 3,0 – 8,0 tampão McIlvaine, pH 8,5 - 9,0 tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 9,5 – 10 tampão glicina-NaOH 0,05 M; em (**B**), a enzima foi diluída em tampão Mcilvaine pH 5,0. As atividades foram realizadas em tampão McIlvaine pH 5,0, a 50 °C.

Cabe ainda ressaltar que, quando comparado à estabilidade enzimática da enzima produzida por fermentação submersa (FSm), a lipase produzida por FSS foi mais estável, uma vez que o valor de $T_{1/2}$ a 50 °C para a enzima produzida por FSm foi apenas de 0,9 h (**Capítulo 2**). Assim como também observado por Mateos Dias et al. (2006), a lipase produzida por FSm mostrou inativação térmica mais rápida que a enzima produzida por FSS, uma vez que a meia-vida a 50 °C foram 0,44 e 0,72 h, respectivamente. Gutarra et al. (2009) relataram que a lipase produzida por *Penicillium simplicissimum* em FSS apresentou estabilidade térmica 20 vezes maior, a 50 °C, que outra lipase produzida por FSm por outra linhagem da mesma espécie de fungo. Estas propriedades enzimáticas da lipase produzida por FSS indicam uma possível aplicação nos processos que requerem temperaturas moderadas, ou moderadamente elevadas como em indústrias de alimentos, de detergentes e oleoquímica (ARAVINDAM et al., 2007; CONTESINI et al., 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento deste trabalho avaliando a fermentação em substrato sólido para produção de lipase por *C. viswanahtii* mostrou que este processo apresenta vantagens para a produção desta enzima, a qual apresentou propriedades promissoras. A utilização de farelo de trigo e bagaço de cevada (1:1) promoveu um efeito sinérgico para a produção de lipase, considerando que todos os parâmetros analisados foram importantes para aumentar a produção da enzima. A maior produção de lipase foi alcançada utilizando-se elevada concentração de gordura de frango (40%, m/m), 3,5% (m/m) de extrato de levedura, temperatura de 30 °C e umidade de 40% durante 5 dias de cultivo (157,33 U/gss). Outros estudos, portanto, ainda devem ser realizados tanto para melhor explorar esta técnica em maior escala, como para investigar a utilização do substrato fermentado como biocatalisador.

A caracterização bioquímica da lipase produzida indicou que esta enzima apresenta atividade ótima em pH 5,0 e a 50 °C. Maior estabilidade em uma ampla faixa de pH e maior estabilidade térmica foi verificada, quando comparada à enzima produzida por esta linhagem em fermentação submersa. Assim, pesquisas adicionais devem identificar e explorar a aplicação desta lipase em processos que requeiram condições moderadas de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, vol. 6, p. 141-158, 2007.
- BABU, I.S.; RAO, G. H. Optimization of process parameters for the production of lipase in submerged fermentation by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Research Journal of Microbiology**, vol. 2, p. 88 - 93 2007.
- BELLON-MAUREL, V.; ORLIAC, O.; CHRISTEN, P. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 881- 896, 2003.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Coconut cake - a potent substrate for the production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. **Acta Biotechnology**, vol. 17, n. 3, p. 241-251, 1997.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Mixed-solid substrate fermentation a novel process for enhanced lipase production by *Candida rugosa*. **Acta Biotechnology**, vol. 18, n. 4, p. 315-324, 1998.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.
- CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 619-630, 2008.
- CERTIK, M.; SLÁVIKOVÁ, L.; MASRNOVÁ, S.; SAJBIDOR, J. Enhancement of nutritional value of cereals with g-linolenic acid by fungal solid-state fermentations. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 44, n. 1, p. 75–82, 2006.
- CHANCHAROONPONG, C.; HSIEH, P-C.; SHEU, S-C. Effect of Different Combinations of Soybean and Wheat Bran on Enzyme Production from *Aspergillus oryzae* S. **APCBEE Procedia**, vol. 00, p. 000–000, 2012.
- CHIU, M. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. Fracionamento a seco da gordura de frango em escala piloto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 43, n. 3, p. 421-434, 2007.
- CONTESINI, F.J.; CARVALHO, P. O. Esterification of (R,S)-ibuprofen by native and commercial lipases in a two-phase system containing ionic liquids. **Tetrahedron Asymmetry**, vol.17, p. 2069-2073, 2006.
- CONTESINI, F. J.; LOPES, D. B.; MACEDO, G. A.; NASCIMENTO, M. G.; CARVALHO, P. O. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 67, p. 163–171, 2010.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. **Journal of Food Engineering**, vol. 76, p. 291–302, 2006.

- DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; FREITAS, S. C. FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A. R.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 39, p. 676-681, 2008.
- EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; PURUSHOTHAMAN, S.; ROSE, C.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMINI, N. R. Corn Steep Liquor as a Nutrition Adjunct for the Production of *Aspergillus niger* Lipase and Hydrolysis of Oils Thereof. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 57, p. 10658–10663, 2009.
- EDWINOLIVER, N.G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; NAKAJIMA KAMBE, T.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 6791–6796, 2010.
- GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure Applied Chemistry**, vol. 77, n. 1, p. 251–262, 2005.
- GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 518–526, 2007.
- GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E. D. C. CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR., G. L. Lipase production by solid-state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 121–124, p. 105 – 116, 2005.
- GUTARRA, M. L. E.; MATEUS, A.; GODOY, G.; MAUGERI, A. F.; RODRIGUES, M. B.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 5249–5254, 2009.
- HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836-4844, 2010.
- HOSSEINPOUR, M. N.; NAJAFPOUR, G. D.; YOUNESI, H.; KHORRAMI, M. Submerged cultures studies for lipase production by *Aspergillus niger* NCIM 584 on soya flour. **Middle-East Journal of Scientific Research**, vol. 7, no. 3, p. 362 – 366, 2011.
- IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. Optimization of media constituents for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). **Advances in Bioscience and Biotechnology**, vol. 1, p. 115-121, 2010.
- JAVED, M. M.; ZAHOOR, S.; SHAFAT, S.; MEHMOODA, I.; GUL, A.; RASHEED, H.; BUKHARI, A. I.; AFTAB, M. N.; IKRAM-UL-HAQ. Wheat bran as a brown gold: Nutritious value and its biotechnological applications. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 6, n. 4, p. 724-733, 2012.

- KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger*, by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, vol. 33, n. 5, p. 505-511, 1998.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, vol. 47, p. 555–569, 2012.
- KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosystem Engineering**, vol. 31, p. 119-125, 2008.
- KUMAR, S. S.; GUPTA, R. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. **Process Biochemistry**, vol. 43, p. 1054-1060, 2008.
- LAKSHMI, B. B.; KANGUEANE, P.; ABRAHAM, B.; PENNATHUR, G. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). **Letters in Applied Microbiology**, vol 29, p. 66-70, 1999.
- LEE, K-T.; FOGLIA, T. A. Synthesis, purification, and characterization of structured lipids produced from chicken fat. **JAOCs**, vol. 77, n. 10, p. 1027-1034, 2000.
- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 715 - 721, 2002.
- MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 1729–1735, 2008.
- MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **Journal Genetic Applied Microbiology**, vol. 53, p. 247–253, 2007.
- MATEOS DIAZ, J. C.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F. Lipase from thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 1042–1050, 2006.
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y.; SEKIGUCHI, J. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 77, no. 5, p. 490 – 495, 1994.
- PANDEY, A. Solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 13, p. 81-84, 2003.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, vol. 35, p. 1153–1169, 2000.

- PAPANIKOLAOU, S.; CHEVALOT, I.; GALIOTOU-PANAYOTU, M.; KOMATIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Industrial derivative of tallow: a promising renewable substrate for microbial lipid, single cell protein and lipase production by *Yarrowia lipolytica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 10, no. 3, 2007.
- POGORI, N.; AHMAD, C.; YAN, X.; DONG, W. Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. **Biotechnology**, vol. 7, p. 710 – 717, 2008.
- RAHARDJO, Y. S. P.; SIE, S.; WEBER, F. J.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. **Biomolecular Engineering**, vol. 21, p. 163 – 172, 2005.
- RAMACHANDRAN, S.; SINGH, S. K.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, vol. 98, p. 2000–2009, 2007.
- RAMANI, K.; CHOCKALINGAM, E.; SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 37, p. 531–535, 2010.
- RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, vol. 43, p. 1132 – 1137, 2010.
- RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZALEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 41, p. 2264 – 2269, 2006.
- RUCHI, G.; GUPTA, G.N.; VAMSIKRISHNAN, M.; KHARE, S.K. Protein coated microcrystals of *Pseudomonas aeruginosa* PseA lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 151, p. 160-166, 2008.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDUL KARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. **Resources Conservation Recycle**, vol. 58, p. 36-44, 2012.
- SEDMAK, J. J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, *Analytical Biochemistry*, vol. 79, p. 544–552, 1977.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, vol. 19, p. 627 - 662, 2001.
- SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for ‘whole-cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, vol.43, p. 219 – 224, 2008.

- TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1495–1502, 2004.
- TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 57, p. 292–298, 2009.
- TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess and Technology**, vol. 3, p. 182–196, 2010.
- UL-HAQ, I; IDREES, S.; RAJOKA, M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, vol. 37, p.637–641, 2002.
- VALERO, F.; DEL RIO, J.; POCH, M.; SOLÁ, C. Fermentation behavior of lipase production by *Candida rugosa* growing on different mixtures of glucose and olive oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 72, no. 5, p. 399 – 401, 1991.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetics Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.

CAPÍTULO 5

**Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de uma
lipase ácida de *Candida viswanathii***

RESUMO

Este estudo teve por objetivo purificar, imobilizar e caracterizar a lipase produzida por *Candida viswanathii*, nas melhores condições de produção da enzima anteriormente estabelecidas. A enzima foi purificada utilizando diálise e cromatografia de interação hidrofóbica em octil agarose equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo eluída com 0,8% de Triton X-100. O rendimento do processo foi de 70,8%, a atividade específica final de 721,0 U/mg de proteína e o fator de purificação de 19,5. A amostra apresentou homogeneidade eletroforética, sendo a massa molecular da enzima estimada em 69 kDa por SDS-PAGE. A enzima foi imobilizada em octil Sepharose, apresentando rendimento de 59,6% e atividade específica de 428,60 U/mg de proteína. O derivado da imobilização apresentou 100% de atividade após 3 ciclos de reuso. A lipase livre foi estável em uma ampla faixa de pH, de ácido a levemente alcalino, e em solventes orgânicos polares e apolares; a lipase imobilizada apresentou aparente ativação na região de pH 2,5 a 7,0 e em vários dos solventes orgânicos testados. A imobilização aumentou muito a termoestabilidade da enzima, sendo o $T_{1/2}$ da enzima livre a 45 °C de 4 min, enquanto que a enzima imobilizada apresentou mais de 70% de atividade após 180 min nessa mesma temperatura e meia-vida de 175 min a 50 °C. As atividades da enzima livre e da imobilizada foram pouco alteradas na presença de íons metálicos e ativadas na presença de DTT e β -mercaptoetanol. A enzima tanto na forma livre, quanto na imobilizada apresentou maior atividade sobre ésteres de cadeia longa. As constantes cinéticas para a enzima livre e imobilizada foram: K_m 0,16 mM e 0,08 mM, V_{max} 889,6 e 900,1 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. A constante k_{cat} da enzima livre apresentou o valor de 868 s^{-1} e eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) de $5,4 \times 10^6 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Palavras-chave: lipase, triacilglicerol hidrolase, *Candida viswanathii*, purificação de enzima, imobilização de enzima, caracterização enzimática.

INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C. 3.1.1.3) catalisam a hidrólise de ligações ésteres de triacilgliceróis de cadeia longa em um sistema de interface orgânico-aquoso, por um mecanismo peculiar de ativação interfacial (SARDA e DESNUELLE, 1958; VERGER, 1997; VILLENEUVE et al., 2000; VAKHLU e KOUR, 2006). Seu papel fisiológico é catalisar a hidrólise e síntese seqüencial de triacilgliceróis, fornecendo diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres (SNELLMAN e COLWELL, 2004). O deslocamento do equilíbrio no sentido da hidrólise ou síntese é controlado pela quantidade de água presente no meio reacional; em presença de água a hidrólise de ésteres é a reação principal, contudo em solventes orgânicos pode ocorrer a esterificação (PANDEY et al., 1999). Além disso, as lipases podem catalisar outras reações como transesterificação, aminólises e lactonização, dependendo da atividade de água (PAQUES e MACEDO, 2006).

Lipases microbianas são excelentes biocatalisadores industriais apresentando importantes propriedades quanto à especificidade e seletividade, além de catalisar reações sob condições ambientais favoráveis (RAMANI et al., 2012). Estas enzimas são utilizadas em inúmeras aplicações práticas, incluindo formulação de detergentes, degradação de óleos e gorduras, sínteses de fármacos e de ésteres responsáveis por aroma e sabor, bem como na produção de cosméticos (REETZ, 2002; HASAN et al., 2006). Em processos industriais como na produção de biodiesel, na hidrólise de óleos e gorduras para tratamento de efluentes e na produção de detergentes, as lipases podem ser empregadas como misturas heterogêneas ou parcialmente purificadas (WU et al., 1996; VALLADÃO et al., 2007; SHARMA e RATHORE, 2010). Em outros setores como nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas, estas enzimas são usadas como preparações purificadas (GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006), embora um elevado fator de purificação torne o processo mais caro e reduza a recuperação da enzima.

Muitas lipases foram extensivamente purificadas e caracterizadas, sendo que os métodos mais utilizados para purificação foram a precipitação com sulfato de amônio, a cromatografia de troca iônica, filtração em gel e cromatografia de interação hidrofóbica (SHARMA et al., 2001). Já em outros estudos, as lipases foram purificadas e cristalizadas (KORDEL et al., 1991; ERICSSON et al., 2008; ANGKAWIDJAJA et al., 2010).

As lipases purificadas foram caracterizadas quanto à atividade e estabilidade em diferentes pH, temperatura e solventes. O efeito de íons metálicos e de agentes redutores

também foi avaliado (SHARMA et al., 2002; YU et al., 2007; LIU et al., 2008; RAMANI et al., 2010; DHEEMAN et al., 2011).

Em alguns casos, a purificação de lipases permitiu o isolamento de isoformas que apresentaram propriedades distintas com relação à massa molecular, atividade e estabilidade em diferentes pH e temperaturas e também sequências primárias. Rúa et al. (1993) relataram a separação de duas isoformas da lipase produzida por *Candida cylindracea* com massa molecular de 64 kDa (lipase A) e 62 kDa (lipase B) e ponto isoelétrico de 5,5 e 4,9, respectivamente. Ibrik et al. (1998) isolaram uma lipase de *Penicillium cyclopodium* com massa molecular de 29 kDa, pH ótimo entre 8 e 10 e estabilidade a 35 °C; enquanto que uma segunda lipase deste fungo apresentou massa molecular entre 40-43 kDa, pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 40 °C (CHAHINIAN et al., 2000).

Técnicas de imobilização têm sido cada vez mais utilizadas industrialmente a fim de facilitar tanto a separação entre os biocatalisadores e os efluentes, quanto à recuperação e purificação dos produtos (ARICA et al., 2010). Vários métodos de imobilização de lipases têm sido relatados como a adsorção (KURTOVIC et al., 2011) e a ligação covalente em suporte insolúvel (MONIER et al., 2010). Imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos tem sido muito empregada como uma alternativa rápida e barata para obtenção de amostras homogêneas em etapas simples, que apresentam alto rendimento e, em alguns casos, resulta em ativação da enzima imobilizada nesses suportes (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2004).

Os objetivos desta etapa do trabalho foram purificar e imobilizar uma lipase ácida produzida por *C. viswanathii* em condições de cultivo previamente determinadas em fermentação submersa e, em seguida, caracterizar bioquimicamente a lipase livre e na forma imobilizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem, cultivo e manutenção

A linhagem de *Candida viswanathii* foi isolada de uma lagoa de estabilização do tratamento de água residuária da Refinaria do Planalto Paulista (REPLAN/Petrobrás),

Paulínia, SP. A linhagem está disponível no Centro de Estudos Ambientais – CEA/UNESP. A referida levedura foi mantida em meio Agar extrato de malte. Repiques das culturas foram realizados periodicamente, sendo estas então incubadas por três dias a 28 °C. Após esse período, a linhagem foi utilizada para os cultivos ou armazenada a 4 °C.

Condições de cultivo e obtenção do extrato proteico extracelular

O meio líquido de Vogel (VOGEL, 1956) foi preparado com as seguintes modificações: 1,5% (m/v) de azeite de oliva, em substituição à glicose, e 0,2% (m/v) de extrato de levedura, em substituição ao nitrato de amônio; pH inicial 6,0. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultivo, previamente autoclavados a 121 °C, por 20 min. Os meios de cultivo foram então inoculados com 1 mL de uma suspensão contendo 10^7 células/mL e mantidos por 72 horas, sob agitação orbital de 210 rpm, a 28 °C. Após o crescimento, as células foram separadas do meio por centrifugação (8500g, 30 min, 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado como preparação de proteínas e enzimas extracelulares.

Determinação da atividade enzimática

A atividade lipase foi determinada com *p*-nitrofenil palmitato (pNPP) como substrato. Este foi primeiramente solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e então diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine pH 3,5 contendo 0,5% de Triton X-100. A hidrólise do pNPP foi determinada descontinuamente a 40 °C pela liberação do *p*-nitrofenolato. Após pré-incubação do substrato em banho-maria por 5 min., a reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL da amostra devidamente diluída. A reação foi interrompida em diferentes intervalos com choque térmico (90 °C, 1 min), seguido da adição de 1 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a 405 nm [coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol (pNP) nessas condições $1,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. Controles foram preparados sem adição de enzima. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de pNP por mL por min. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Determinação de proteínas

Neste trabalho, a determinação quantitativa de proteínas foi realizada utilizando o método BCA proposto por Smith et al. (1985), tendo soroalbumina bovina como padrão. Nas frações das etapas cromatográficas, os níveis de proteínas foram estimados pelas medidas das absorvâncias a 280 nm.

Purificação da lipase produzida por *C. viswanathii*

O sobrenadante da centrifugação do caldo de cultura foi dialisado contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 por 6 h., sendo realizadas trocas deste tampão a cada 2 h. Após a diálise, a amostra foi então aplicada na coluna (2,0 x 20,0 cm) pré-empacotada com octil agarose (HiprepTM 16/10 Octyl Sepharose FF fast flow, GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo coletadas frações de 3,0 mL, usando um fluxo de 2,0 mL/min. Após a lavagem da coluna com este mesmo tampão, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 100 mL de um gradiente linear crescente de 0 – 1% (v/v) de Triton X-100 no mesmo tampão. Após determinação da atividade lipase, as frações com elevada atividade foram reunidas. Todas as etapas de purificação foram realizadas a 4 °C, e, ao final de cada uma delas procedeu-se a determinação de proteínas e da atividade enzimática da amostra resultante, sendo que alíquotas das mesmas foram reservadas para caracterização bioquímica e eletroforética.

Imobilização da atividade lipase de *C. viswanathii*

Após diálise do sobrenadante de cultivo realizada como citado no item anterior, a enzima foi imobilizada em coluna de vidro de 12 x 1,5 cm, contendo a resina octil Sepharose, equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. A amostra foi aplicada usando um fluxo de 2 mL/min e, após a lavagem da coluna com o mesmo tampão, a resina contendo as proteínas foi coletada e mantida no referido tampão, a 10 °C.

Amostras da enzima assim imobilizadas foram utilizadas para caracterização bioquímica, sendo uma alíquota reservada para caracterização eletroforética.

Remoção do Triton X-100

Para caracterização eletroforética da amostra purificada foi necessário remover o detergente Triton X-100, devido à sua interferência nesse procedimento. Essa remoção foi realizada empregando-se a resina Calbiosorb™ Adsorbent (Calbiochem®, San Diego, E.U.A). A resina foi equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 e aplicada diretamente na amostra de enzima purificada contendo o detergente. A suspensão obtida foi incubada a 10 °C por 45 min sob agitação lenta, e, posteriormente, mantida em repouso. O sobrenadante contendo a solução de proteínas livre de detergente foi então separado por centrifugação e submetido à análise eletroforética.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio - SDS-PAGE

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970), adicionando-se ureia 5 M aos géis de corrida (10%) e empilhamento (5%) e 8 M de ureia à amostra, conforme descrito por Lesuisse et al. (1993). Esta metodologia foi utilizada para a verificação do estado de pureza da enzima livre e da enzima imobilizada, bem como para a determinação da massa molecular da enzima livre.

As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 17,5%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1% e Tris 0,12 M, pH 6,8) na presença de 10% de β -mercaptoetanol, aquecidas por 5 min em água fervente e resfriadas a temperatura ambiente antes da adição da ureia. No caso da enzima imobilizada, a resina foi fervida por 15 min com SDS e β -mercaptoetanol. Após resfriamento, foi adicionada uréia para se obter concentração final de 8 M, sendo a mistura mantida à temperatura ambiente por 24 h. A seguir, a resina foi removida por centrifugação e ao sobrenadante foi adicionado o tampão de amostra como anteriormente descrito, sendo então submetido a eletroforese.

As eletroforeses foram realizadas com tampão Tris-glicina (0,025 M: 0,192 M) pH 8,3 com SDS 0,1% (m/v), durante aproximadamente 3 h., sob corrente de 100 V. Após a corrida, procedeu-se a coloração das proteínas com *coomassie brilliant blue* R-250 0,1% (m/v) em metanol/ácido acético/água (4/1/5, v/v/v), por um período de 2 h. Posteriormente, o gel foi

descolorado com solução metanol/ácido acético/água (3/1/6, v/v/v) até a visualização das bandas de proteínas.

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

Excetuando-se as amostras de enzima livre utilizadas para a determinação da massa molecular por SDS-PAGE, as demais amostras utilizadas para a caracterização da enzima livre continham 0,8% de Triton X-100.

Determinação da massa molecular por SDS-PAGE

A massa molecular da enzima purificada foi estimada a partir do gráfico do logaritmo da massa molecular das proteínas padrão contra suas respectivas mobilidades relativas em relação ao azul de bromofenol. Os padrões α -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e fosforilase b (97 kDa) foram utilizados também com a adição de ureia na concentração final de 8 M.

Reuso da lipase imobilizada

O reuso da enzima imobilizada foi realizado em tubos de ensaios contendo 50 mg do derivado da imobilização no meio reacional com 0,5 mM *p*-nitrofenil palmitato anteriormente descrito. Decorrido o tempo de reação, o meio foi removido e o derivado da imobilização lavado duas vezes com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo que, em cada etapa de lavagem, a resina foi centrifugada por 2 min., a 4 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida, um novo ciclo de reação foi iniciado adicionando-se novo meio reacional com substrato. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

Para determinação do pH ótimo de atividade da enzima livre e imobilizada, os ensaios foram realizados em tampão glicina-HCl 0,05 M para a faixa de pH 2,0 – 3,0 e tampão McIlvaine para os pH de 3,0 – 8,0. Os mesmos tampões foram utilizados tanto para o preparo do substrato enzimático, quanto para a diluição das amostras. A atividade foi determinada a 40 °C, conforme descrito anteriormente.

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

Estabilidade térmica e em diferentes pH

A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi avaliada pela incubação das amostras em diferentes temperaturas na ausência do substrato, sendo que a enzima livre foi incubada a 30, 40 e 45 °C e a enzima imobilizada a 40, 45, 50 e 60 °C. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo variados, transferidas para banho de gelo, e então utilizadas para a determinação da atividade residual, que foi ensaiada nas condições anteriormente citadas. A partir dos resultados obtidos, estimou-se o valor de T_{50} .

Para determinação da estabilidade em diferentes valores de pH, incubou-se alíquotas da enzima livre e imobilizada em diferentes tampões, na proporção 1:2 (v/v), que compuseram a faixa de pH de 2,0 a 8,0. O procedimento foi realizado a 10 °C, e, após 24 h, determinou-se a atividade enzimática residual. O controle das reações foi realizado determinando-se a atividade enzimática imediatamente após a adição da amostra aos respectivos tampões. A dosagem da atividade lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

Efeito de substâncias e íons metálicos

O efeito de substâncias sobre a atividade da enzima livre e imobilizada foi avaliado pela adição das mesmas às misturas de reação, realizando-se o cálculo das atividades em relação ao controle que não continha nenhuma dessas substâncias.

Foram avaliados os efeitos das seguintes substâncias: cloreto de mercúrio II, cloreto de cobre II, cloreto de magnésio, cloreto de cobalto II, cloreto de cálcio, cloreto de bário, cloreto de amônia, cloreto de sódio, sulfato de zinco, sulfato de manganês II, acetato de chumbo, sulfato de magnésio, dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 1,4-ditiotreitól (DTT), β -mercaptoetanol, Tween 20, Tween 80, deoxicolato de sódio e ureia, nas concentrações de 2 e 10 mM. A dosagem da atividade de lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

Estabilidade em solventes orgânicos

A estabilidade da enzima livre e imobilizada em solventes orgânicos foi avaliada após a incubação a 10 °C, por 1 h, sob agitação orbital de 150 rpm em frascos hermeticamente fechados. Foram avaliados os solventes glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol, metanol, acetonitrila, etanol, acetona, 1-propanol, 2-propanol, n-butanol, tolueno, xilol, n-hexano e iso-octano, todos na concentração de 10%. A dosagem da atividade lipase foi realizada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

Especificidade por substratos

Especificidade da enzima livre ou imobilizada foi avaliada a partir da dosagem da atividade utilizando-se os substratos sintéticos *p*-nitrofenil acetato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil octanoato, *p*-nitrofenil decanoato, *p*-nitrofenil laurato, *p*-nitrofenil miristato, *p*-nitrofenil palmitato e *p*-nitrofenil estearato, os quais foram avaliados na concentração final de 0,05 M em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

Cinética enzimática

As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram determinadas conforme representação gráfica proposta por Lineweaver-Burk (LINEWEAVER e BURK, 1934). A dosagem da atividade lipase foi realizada utilizando-se diferentes concentrações do substrato pNPP em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

RESULTADOS

Purificação da lipase de *Candida viswanathii*

Inicialmente, várias tentativas de purificação de lipase extracelular de *C. viswanathii* foram realizadas empregando-se técnicas clássicas de purificação de proteínas, como fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Na etapa de fracionamento com sulfato de amônio verificou-se que 5,0% da atividade precipitava na faixa de 0-30% de saturação, 23,3% na faixa de 30-60%, 10,9% na faixa de 60-90%, enquanto que a maior proporção da enzima (60,5%) permanecia no sobrenadante de 90% de saturação. Após diálise, este sobrenadante foi usado para realização de testes em tubo contendo resinas de troca iônica, tanto DEAE Sephadex A-50 quanto CM Sephadex C-50, equilibradas em tampões de diferentes pH, observando-se baixa adsorção da atividade lipase em todas as condições avaliadas. Tal fato sugere que a lipase em estudo não deve apresentar quantidade significativa de aminoácidos carregados em sua superfície, resultando em pequena interação da enzima com os grupos trocadores das resinas. Em uma cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100, a atividade foi eluída no volume morto da coluna (cromatograma não apresentado), indicando massa molecular acima de 150 kDa, limite de exclusão desta coluna. Uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de octil agarose equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, contendo sulfato de amônio 1 M, indicou que parte da atividade lipase se ligava a essa resina, mas não era eluída nem mesmo com a retirada total do sal. Uma estratégia de purificação desta lipase de *C. viswanathii* foi então planejada usando cromatografia de interação hidrofóbica, nessas mesmas condições, sem a adição de sulfato de amônio.

A purificação da lipase de *C. viswanathii* foi realizada utilizando-se o sobrenadante de cultura centrifugado, o qual foi dialisado contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 a 4 °C. Esta amostra foi então submetida à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna octil agarose equilibrada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sem a adição de sal. Após eluição da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão e, posteriormente, as proteínas ligadas foram eluídas com um gradiente crescente de Triton X-100, de 0 a 1,0% (**Figura 1**). Nessas condições, toda a atividade lipase se ligou à resina, sendo eluída somente com 0,8% de Triton X-100. Após dosagem das atividades nas frações coletadas, aquelas que apresentaram atividade lipase foram reunidas constituindo então a amostra de enzima purificada, pois esta preparação se mostrou homogênea em SDS-PAGE, apresentando uma banda de massa molecular correspondente a 69,0 kDa (**Figura 2**).

Lipases isoladas de outras espécies de *Candida*, como *C. rugosa*, *C. cylindracea* e *C. antarctica*, apresentaram massas moleculares que variaram de 33 a 64 kDa (PERNAS et al., 2000; RÚA et al., 1993; YAO et al., 2011; DIMITRIJEVIC et al., 2012).

Tentativas de determinação da massa molecular da lipase purificada por cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 e G-200, mesmo em presença de uréia ou detergente como Triton-X100 a 1,0%, não foram bem sucedidas, pois a enzima era sempre eluída no volume morto, indicando massa molecular superior a 600 kDa. Esses dados sugerem que a concentração da enzima, bem como a adição de sal anteriormente relatada, que originou uma fração de lipase que não se ligou à octil agarose, deve favorecer a formação de agregados, como observado para outras lipases microbianas como relatado por Palomo et al. (2003) para as de *C. rugosa*, *Humicola lanuginosa* e *Mucor miehei*; Fernández-Lorente et al. (2003) para as de *Pseudomonas fluorescens* e por Wilson et al. (2006) para a lipase de *Alcaligenes* sp., entre outros. O comportamento de agregação da lipase de *C. rugosa* foi claramente demonstrado por filtração em gel e SDS-PAGE por Liou et al. (1998), que obtiveram 4 picos com os pesos moleculares > 440, 240, 130 e 60 kDa em Sephadex G-200 e apenas um de 60 kDa por SDS-PAGE.

A lipase foi então purificada por um procedimento prático, rápido e relativamente barato, envolvendo apenas duas etapas, o que é muito interessante para ampliação de escala. Na primeira etapa, o teor de proteínas totais foi reduzido em mais de 50%, o que levou a um fator de purificação de 2,13 vezes. Essa diminuição da concentração de proteínas durante a diálise pode ser atribuída à presença de peptídeos provindos do meio de cultura que continha extrato de levedura, bem como possíveis proteases ativas nessas condições, que originariam

oligopeptídeos permeáveis aos poros da membrana usada. Após o segundo passo, o fator de purificação obtido foi de 19,54 vezes, a atividade específica de 721,0 U/ mg de proteína e rendimento final de 70,8% (**Tabela 1**). Essa recuperação pode ser considerada muito boa para purificação de enzimas em geral, e até mesmo excelente quando comparada com os valores de rendimento de purificação de outras lipases, como mostra a **Tabela 1** do Capítulo 1 (Revisão da literatura). Isso também é muito importante do ponto de vista aplicado, pois elevadas recuperações em purificação de enzimas representam menores custos para produção industrial.

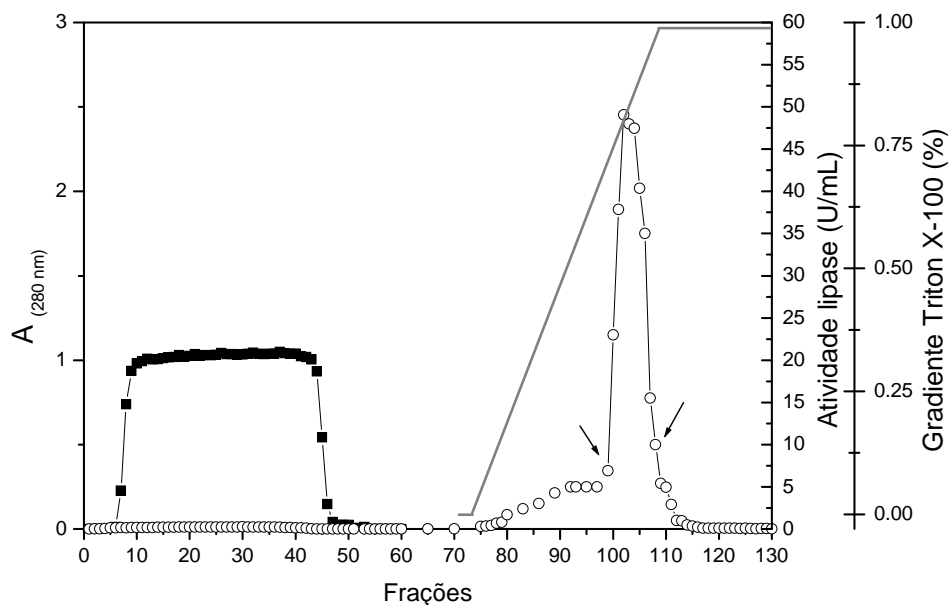


Figura 1. Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *C. viswanathii* em cromatografia de interação hidrofóbica com octil agarose equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. (■) A_{280} ; (○) atividade lipase (U/mL); (—) gradiente de Triton X-100; flechas indicam as frações reunidas.

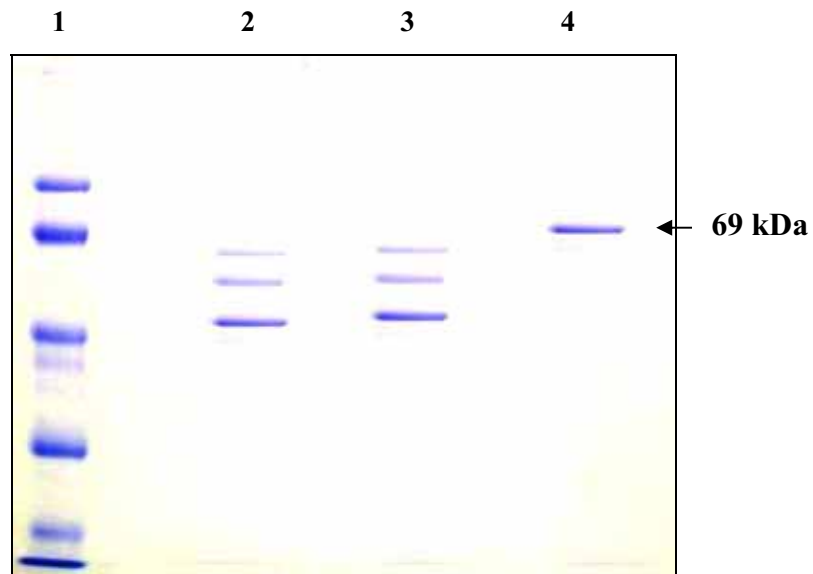


Figura 2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE (10%) da lipase de *C. viswanathii*. Da esquerda para a direita: coluna 1 contém α -lactoalbumina (14,2 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovoalbumina (45 kDa), albumina de soro bovino (66 kDa) e fosforilase b (97 kDa); coluna 2 contém amostra de sobrenadante de cultura; coluna 3 contém amostra dialisada; coluna 4 contém amostra purificada.

Tabela 1. Purificação da lipase produzida por *C. viswanathii*.

Etapa	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg prot.)	Rendimento (%)	Fator de purificação
Filtrado de cultura	1384,2	36,9	37,5	100,0	1,00
Diálise	1250,4	15,6	80,1	90,3	2,13
Octil agarose 4 FF	980,6	1,4	721,0	70,8	19,54

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3,5 a 40 °C.

Imobilização da lipase de *C. viswanathii*

Os resultados obtidos durante a purificação da enzima sugeriram que a mesma poderia ser imobilizada hidrofobicamente em octil agarose para posterior caracterização bioquímica e comparação de suas propriedades com aquelas da enzima livre.

A lipase foi imobilizada repetindo-se as etapas de purificação nas condições anteriormente estabelecidas, sendo que a cromatografia de interação hidrofóbica foi realizada em coluna de octil Sepharose equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. A amostra foi aplicada e, após lavagem da coluna, a resina contendo as proteínas foi coletada e mantida no mesmo tampão, a 10 °C. Neste procedimento, uma fração da enzima (39,4%) não foi imobilizada, possivelmente porque o teor total de proteínas excedeu a capacidade da coluna. A fração imobilizada foi de 59,6% e a atividade específica de 428,6 U/mg de proteína (**Tabela 2**). A atividade específica do derivado foi de 109,16 U/g de resina.

Lipases de outras espécies de *Candida* foram imobilizadas em outros suportes como a de *C. cylindracea* que foi imobilizada por adsorção em zeolito hidrofóbico para a hidrólise de óleo de palma (KNEZEVIC et al., 1998); a de *C. rugosa*, imobilizada por adsorção em um copolímero macroporoso de glicidil metacrilato e etilenoglicol dimetacrilato (MOJOVIK et al., 1998) e a lipase B de *C. antarctica* imobilizada em resina macroporosa por adsorção física em meio orgânico (SUN et al., 2010).

Tabela 2. Imobilização da lipase de *C. viswanathii* em octil Sepharose.

	Atividade total (U)	Proteína (mg)	Atividade específica (U/mg prot)	Rendimento (%)
Filtrado de cultura	1359,8	38,53	35,3	100,0
Diálise	1117,8	16,35	68,4	82,2
Enzima não imobilizada	549,9	13,96	39,4	40,4
Enzima imobilizada	810,0	1,89	428,6	59,6

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3,5 a 40 °C.

Uma amostra do derivado da imobilização foi tratada com SDS e β -mercaptoetanol para a liberação das proteínas ligadas à resina, as quais foram submetidas à análise por SDS-PAGE. O perfil eletroforético (dados não apresentados) mostrou a presença de uma banda forte de massa molecular correspondente a 69,0 kDa e outra banda fraca, indicando a presença de pequena quantidade de outra(s) proteína(s) com propriedades hidrofóbicas similares nesta amostra.

O reuso da lipase imobilizada foi avaliado por experimentos em batelada. Após cada ciclo, a enzima imobilizada foi recuperada por centrifugação, lavada com tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo a amostra novamente centrifugada, e, então, novo meio reacional foi adicionado para determinar a atividade enzimática. Os resultados mostraram que a enzima imobilizada apresentou 100% de atividade nos 3 primeiros ciclos e 68,0% após 5 ciclos de reuso (**Figura 3**).

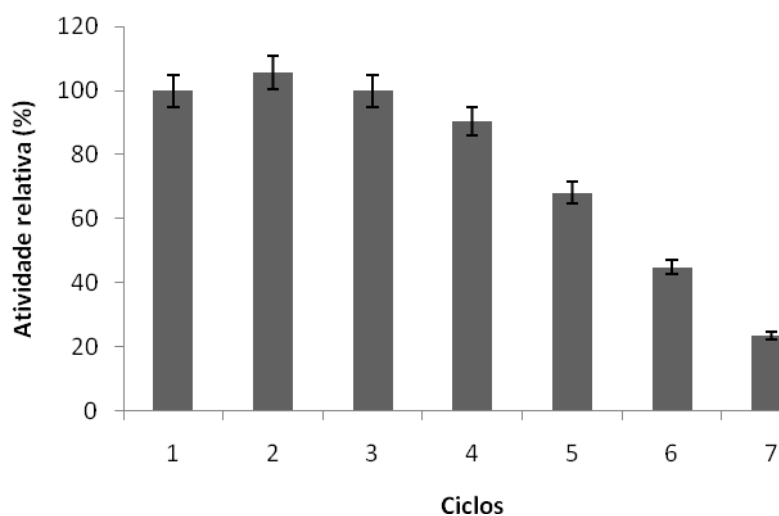


Figura 3. Reutilização da lipase de *C. viswanathii* imobilizada em suporte octil Sepharose. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 3,5 a 40 °C.

Nos ciclos seguintes foi observada uma acentuada redução na atividade, provavelmente, devido à liberação da enzima do suporte para o meio reacional. Uma retenção

da atividade de 55% após 4 ciclos foi observada para a lipase de *C. rugosa* imobilizada em pellets de alginato de cálcio (JEGANATHAN et al., 2005). Em outros trabalhos em que o reuso de uma lipase de *C. rugosa* foi estudada, a retenção da atividade foi de 11% após 3 ciclos da enzima imobilizada em celite (FADILOGLU et al., 1998), e 27% depois de 7 ciclos da enzima imobilizada no suporte polimérico macroporoso anteriormente citado (MOJOVIC et al., 1998). Knezevic et al. (1998) relataram a atividade de 10,5% após 7 ciclos para a lipase de *C. cylindracea* imobilizada em zeolite.

Caracterização bioquímica da lipase livre e imobilizada

Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade

A **Figura 4A** apresenta o efeito do pH do meio reacional sobre a atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada na faixa de 2,0 a 8,0. A maior atividade de ambas as formas da enzima foi observada no pH 4,0. Na faixa de pH de 2,0 a 3,0 a enzima imobilizada apresentou 57% de sua atividade, enquanto que a atividade da enzima livre observada foi de 18 a 42%. Ambas as formas da enzima apresentaram elevada atividade nos pH 3,5 e 4,5, correspondendo a aproximadamente 80% para a enzima livre e 90% para a imobilizada. Entre pH 5,0 e 6,5 ambas as formas apresentaram mais de 65% de atividade e a partir desta faixa houve uma contínua redução até o pH 8,0 (18,6 e 12,8%, respectivamente para a enzima livre e imobilizada).

Os resultados de pH ótimo para a lipase purificada e imobilizada de *C. viswanathii* diferiram daqueles encontrados na literatura para outras lipases produzidas por leveduras deste mesmo gênero. As espécies de *C. antarctica*, *C. rugosa* e *C. cylindracea* produziram lipases com pH ótimo neutro ou alcalino (RÚA et al., 1993; PERNAS et al., 2000; PFEFFER et al., 2006). Lipases ácidas foram descritas em *Aspergillus niger* NCIM 1207 (MHETRAS et al., 2009), *Pseudomonas gessardii* (RAMANI et al., 2010), *Penicillium sp.* (DHEEMAN et al., 2011b) e *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639 (SATHISH YADAV, 2011) entre outras.

As lipases livre e imobilizada apresentaram alta estabilidade na faixa de pH ácido até levemente alcalino (**Figura 4B**). A enzima livre manteve a atividade acima de 60% na faixa de pH entre 2,0 e 7,5, sendo que em pH 7,0 manteve a totalidade da sua atividade e em pH 5,0 e 5,5 reteve mais de 90%. Em pH 8,0 a atividade caiu acentuadamente para 26%. Com a

enzima imobilizada observou-se uma aparente ativação entre os pH 2,5 e 7,0. Entre os pH 3,5 e 7,0, a enzima mostrou aproximadamente 130% de atividade, mas nos pH 7,5 e 8,0 houve redução para 78%. O aumento da atividade observado neste estudo foi semelhante aos verificados para as lipases de *Rhizopus niveus*, *Mucor miehei* e *Humicola lanuginosa* imobilizadas em suporte hidrofóbico (BASTIDA et al., 1998). Os autores observaram que as lipases imobilizadas por adsorção em octil agarose apresentaram uma hiperativação de 6, 7 e 20 vezes, respectivamente, em relação às enzimas livres quando utilizadas para realizar a hidrólise do substrato *p*-nitrofenil propionato, e também interessantes mudanças na estereoespecificidade na hidrólise de éster quiral solúvel. Os resultados sugeriram que a enzima reconheceu o suporte hidrofóbico como uma interface sólida e foram adsorvidas por uma interação entre a região hidrofóbica perto do seu sítio ativo na forma aberta e “hiperativada” (BASTIDA et al., 1998).

A atividade e a estabilidade da lipase de *C. viswanathii* em uma ampla faixa ácida de pH, especialmente da forma imobilizada, indica uma possível aplicação desta enzima nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de aromatizantes, as quais utilizam lipase ativas em condições ácidas (HASAN et al., 2006). Lipases microbianas ativas em pH ácidos são também utilizadas para a síntese de ésteres de aroma como acetato de isoamila (KUMARI et al., 2009), no tratamento de peles e lã na indústria têxtil (HASAN et al., 2006) e também como substituta da lipase pancreática em terapia enzimática (SANI, 2006).

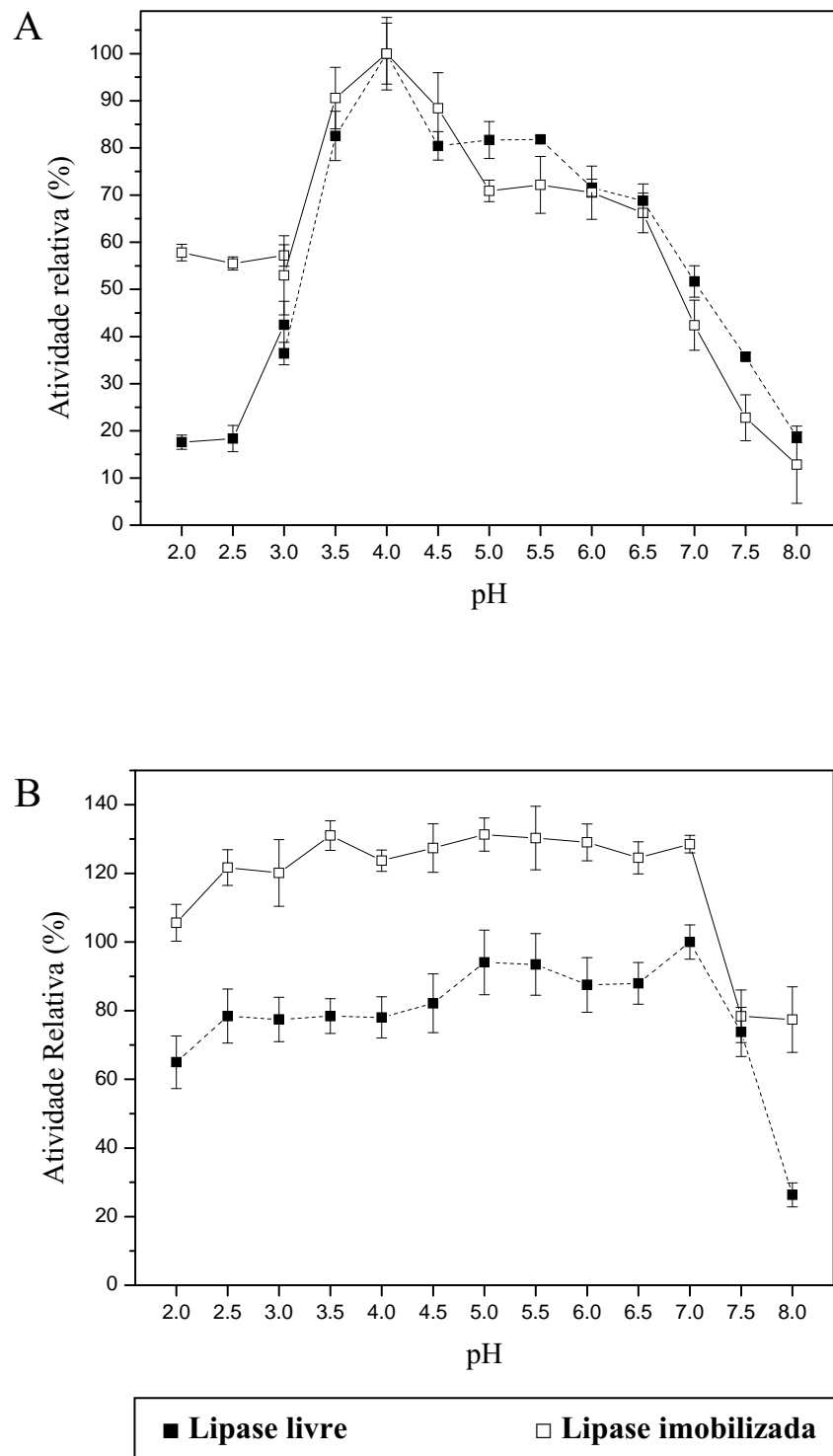


Figura 4. Efeito do pH sobre a atividade (A) e estabilidade (B) da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. (A) A atividade foi determinada em tampão glicina NaOH 0,05 M para a faixa de pH de 2,0 a 3,0 e tampão McIlvaine de 3,0 a 8,0, a 40 °C. (B) A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 40 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 36,0 U/mg prot. para a enzima livre e 38,0 U/mg prot. para a enzima imobilizada.

Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade

A temperatura ótima de atividade da lipase livre e imobilizada é apresentada na **Figura 5**. A atividade máxima das enzimas livre e imobilizada foi verificada a 45 °C. Acima desta temperatura, a atividade da enzima livre reduziu continuamente, apresentando 85 e 63% da atividade máxima a 50 e 55 °C, respectivamente. A enzima imobilizada apresentou maior atividade nessas mesmas temperaturas correspondendo a 97,4 e 83,6% respectivamente, da atividade máxima. Ambas apresentaram apenas 5,0% da atividade a 70 °C. Estes resultados são semelhantes aos observados em outros trabalhos em que a atividade ótima das enzimas imobilizadas não se alterou quando comparada a da enzima livre (GHAMGUI et al., 2007; PEREZ et al., 2007; Yi et al., 2009). Isto não pode ser considerado uma regra geral, já que em outros estudos, a imobilização da enzima acarretou mudanças na temperatura ótima de atividade, como no caso das lipases imobilizadas de *C. rugosa* (VAIDYA e SINGHAL, 2008; ARICA et al., 2010; DENG et al., 2010) e *Saccharomyces cerevisiae* (ZENG et al., 2009).

A semelhança entre os perfis da atividade da enzima livre e da imobilizada em função da temperatura indicou que não ocorreram mudanças significativas na conformação da enzima, as quais seriam promovidas pela interação com o suporte. Imobilização covalente de lipases que resultou em alteração na temperatura ótima, observada nos trabalhos de Bayramoglu e Arica (2008) e Deng et al. (2010), foi atribuída a mudança na conformação da enzima para uma estrutura tridimensional mais rígida.

Condições ótimas de atividade em temperaturas moderadas, como as observadas para a lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*, evitam a necessidade de altas temperaturas requeridas em sistemas não enzimáticos o que pode levar à degradação térmica de produtos das indústrias alimentícias e farmacêuticas, aumentando os custos do processo e os de purificação e refino desses produtos (BALCÃO et al., 1996).

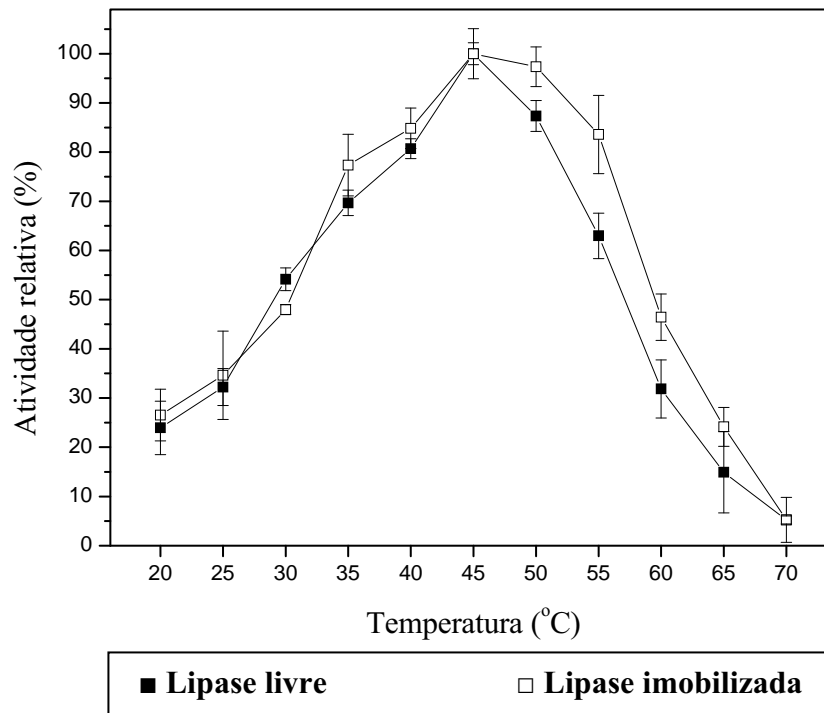


Figura 5. Efeito da temperatura sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0. A atividade controle (100%) correspondeu a 36,0 U/mg prot. para a enzima livre e 38,0 U/mg prot. para a enzima imobilizada.

As estabilidades das enzimas livre e imobilizada foram avaliadas em meio tamponado na ausência de substrato. A enzima livre apresentou baixa estabilidade térmica em temperaturas moderadas, enquanto que a enzima imobilizada mostrou considerável resistência a desnaturação nessas temperaturas e até mesmo em temperaturas mais elevadas (**Figura 6**). A lipase livre reteve 41,0% de sua atividade após 60 min. de incubação a 30 °C, enquanto que a 40 e 45 °C a atividade residual após este período foi de apenas 11% (**Figura 6A**). A meia-vida da lipase livre foi estimada em 27 min. a 30 °C, 3,5 min. a 40 °C e de 4,5 min. a 45 °C. A enzima imobilizada, no entanto, foi muito mais estável nas temperaturas de 40 e 45 °C, retendo 70 e 65% da atividade, respectivamente nestas temperaturas, após 180 min. de incubação (**Figura 6B**). A lipase imobilizada apresentou também elevada estabilidade térmica a 50 °C, mantendo mais de 80% da atividade original após 60 min. de incubação. Os valores de meia-vida a 50 e 60 °C foram 175 e 6,5 min., respectivamente.

Como observado em outros trabalhos que utilizaram as lipases imobilizadas de *C. rugosa* (CHIOU e WU, 2005; JEGANATHAN et al. 2007; MONIER et al., 2010), *C. antarctica* e *Thermomyces lanuginosus* (ONDUL et al., 2009), os resultados aqui apresentados demonstraram que a imobilização por interação hidrofóbica realizada neste trabalho protegeu a estrutura da enzima de mudanças conformacionais provocadas pelo aumento da energia cinética, elevando sua termoestabilidade.

A lipase de *C. rugosa* imobilizada em quitosana por meio de grupos hidroxil ativados manteve a atividade original após 1 hora de incubação a 40 °C, enquanto que a enzima livre foi estável apenas até 30 °C (CHIOU e WU, 2005). Bayramoglu e Arica (2008) imobilizaram uma lipase comercial de *C. rugosa* em suportes magnéticos contendo poli(glicidilmetacrilato-metilmacrilato) sendo que após 120 min. a 55 e 65 °C a enzima imobilizada reteve aproximadamente 84 e 57% da atividade original, respectivamente e a enzima livre apresentou os valores de 63 e 28%, respectivamente. Kaewthong et al. (2005) relataram a utilização de uma lipase de *Pseudomonas* sp. imobilizada no suporte hidrofóbico Acurrel EP100 para a produção contínua de monoacilgliceróis por glicerólise de oleína de palma. Nesse caso, a enzima imobilizada apresentou-se mais estável, retendo 90% da atividade após incubação por 24 h a 40 °C, sendo sua atividade ótima a 50 °C.

Os resultados relativos à termoestabilidade da lipase imobilizada de *C. viswanathii* obtidos neste trabalho apresentam extrema importância operacional para futuras aplicações industriais.

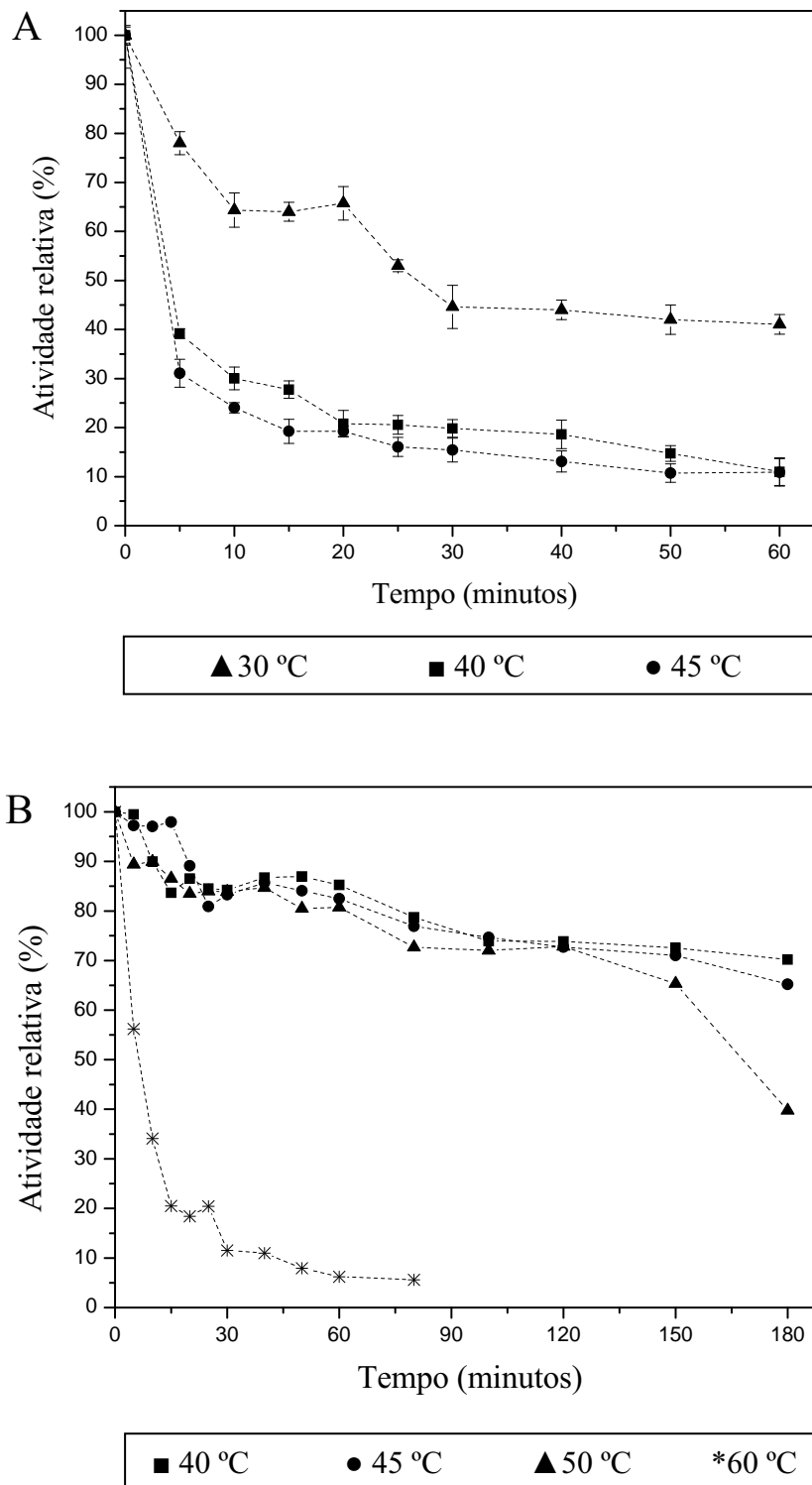


Figura 6. Termoestabilidade da lipase livre (A) e imobilizada (B) de *C. viswanathii*. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 72,1 U/mg prot. para a enzima livre e 73,7 U/mg prot. para a enzima imobilizada.

Efeito de íons sobre a atividade

A **Tabela 3** apresenta o efeito de vários íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada. O íon Mn^{2+} ativou a atividade da lipase livre e imobilizada a 2 mM, entretanto, o mesmo não foi observado na presença deste íon a 10 mM. Os íons Mg^{2+} e Zn^{2+} também apresentaram efeito de ativação nas concentrações de 2 mM e 10 mM, respectivamente, mas apenas para a lipase livre.

O efeito ativador desses íons também foi observado para a lipase de *Burkholderia* sp. HY 10 (PARK et al., 2007), porém, não foi observado para as lipases de *Bacillus* sp. RSJ-1 (SHARMA et al., 2002). As lipases de *C. rugosa* LipA, LipB e LipC foram ativadas apenas pelos íons Mg^{2+} e Ca^{2+} na concentração de 10 mM. Para outras lipases microbianas nenhum efeito sobre a atividade foi observado na presença destes íons (ABBAS et al., 2002; YU et al., 2007; LIU et al., 2008; DHEEMAN et al., 2011).

Os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , NH_4^+ e Pb^{2+} não apresentaram efeito significativo sobre a atividade tanto da lipase livre como imobilizada. O íon Co^{2+} apresentou efeito inibitório apenas na concentração de 10 mM para ambas as preparações da enzima. O íon Cu^{2+} inibiu fortemente a atividade da enzima livre nesta mesma concentração, mas não afetou a atividade da enzima imobilizada. O íon Hg^{2+} , na concentração de 10 mM, inibiu moderadamente a enzima livre e fortemente a enzima imobilizada. A inibição por Hg^{2+} também foi observada para as lipases de *Ophiostoma piceae* (GAO e BREUIL, 1998), *Mucor* sp. (ABBAS et al., 2002), *Aureobasidium pullulans* (LIU et al., 2008) e *Penicillium* sp. DS-39 (DHEEMAN et al., 2011) em concentrações que variaram de 1 a 20 mM. Esses resultados dos autores anteriormente citados, juntamente com aqueles aqui obtidos para a lipase de *C. viswanathii*, sugerem a presença de grupos tiol de cisteína no sítio ativo ou próximo a ele. O sítio ativo de várias lipases é constituído da tríade catalítica Ser(nucleófilo)-Asp/Glu(ácidos)-His, similar ao das serino proteases. Os resíduos da tríade são variáveis e cisteína foi identificada como nucleófilo, podendo modular mudanças conformacionais das lipases na interface e estar envolvido no reconhecimento do substrato (BENDIKIENE et al., 2004).

Tabela 3. Efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii*.

Substâncias	Atividade relativa (%)			
	Lipase livre		Lipase Imobilizada	
	2 mM	10 mM	2 mM	10 mM
Controle	100,0 ± 4,5	100,0 ± 7,4	100,0 ± 7,7	100,0 ± 4,1
HgCl ₂	94,5 ± 9,4	60,1 ± 5,6	93,5 ± 8,7	14,7 ± 3,9
ZnSO ₄	96,8 ± 8,5	112,4 ± 3,2	99,4 ± 7,9	100,4 ± 7,8
CuCl ₂	91,8 ± 10,2	3,9 ± 5,1	97,6 ± 5,2	97,6 ± 6,9
CoCl ₂	96,1 ± 11,9	50,1 ± 5,1	92,4 ± 4,7	56,3 ± 5,2
CaCl ₂	101,9 ± 11,9	101,0 ± 9,9	100,0 ± 8,9	104,4 ± 12,2
BaCl ₂	107,9 ± 3,5	100,3 ± 6,1	96,2 ± 6,3	100,3 ± 7,7
MnSO ₄	113,0 ± 5,2	108,8 ± 8,3	120,9 ± 9,4	107,2 ± 2,8
NaCl	103,0 ± 8,6	102,4 ± 7,7	106,4 ± 8,0	105,3 ± 6,3
NH ₄ Cl	103,2 ± 5,5	102,0 ± 8,4	104,9 ± 7,0	105,6 ± 9,7
MgSO ₄	117,4 ± 8,5	101,7 ± 7,5	108,2 ± 6,2	106,9 ± 8,9
Pb(CH ₃ COO) ₂	104,2 ± 6,4	107,3 ± 10,6	107,1 ± 5,9	104,9 ± 10,3

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 15 U/mg prot. para a enzima livre e 13 U/mg prot. para a enzima imobilizada. ND: atividade não detectada nas condições de ensaio.

Efeito de substâncias sobre a atividade da lipase

A **Tabela 4** apresenta o efeito de outras substâncias sobre a atividade da lipase livre e imobilizada. Os agentes 1,4-ditiotreitol (DTT) e β -mercaptoetanol apresentaram efeito ativador, a 10 mM, tanto para a lipase livre como para a imobilizada. Esta constatação confirma a importância de cisteína para o desempenho da função da enzima, podendo ser explicada pela prevenção da oxidação dos grupos tiol por estes agentes. Ativação por β -mercaptoetanol também foi observada para as lipases de *Burkholderia* sp. HY-10 (PARK et al., 2007) e *Metarhizium ansioptiae* (SILVA et al., 2009), enquanto que o efeito ativador do DTT para uma lipase de *Candida deformans* (BOUTUR et al., 1995). Contudo, a maioria das lipases estudadas não foram ativadas nem inibidas na presença destes mesmos agentes (YAMAGUCHI et al., 1996; GAO e BREUIL, 1998; LIEBETON et al., 2001; SHARMA et al., 2002; CASTRO-OCHOA et al., 2005; NAWANI et al., 2006; YU et al., 2007; OGINO et al., 2008; NAM et al., 2009; RAMANI et al., 2010).

O agente quelante EDTA inibiu moderadamente a atividade da enzima livre nas concentrações 2 mM e 10 mM, entretanto, este efeito não foi observado com a enzima imobilizada. Os resultados encontrados para a lipase purificada de *C. viswanathii* indicam a importância de íons metálicos para a atividade desta enzima. Resultados semelhantes foram observados com as lipases purificadas de *Bacillus* sp. (NAWANI et al., 1998) e *Mucor* sp. (ABBAS et al., 2002). Inibição acentuada de lipases por EDTA foi observada para a de *Burkholderia multivorans* (DANDAVATE et al., 2009) e *Pseudomonas gessardii* (RAMANI et al., 2010), sugerindo que estas são metaloenzimas.

O fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) apresentou efeito inibitório moderado a 2 mM e acentuado a 10 mM tanto para a enzima livre como para a imobilizada. Estes resultados sugerem que a lipase de *C. viswanathii* pode ser serino hidrolase, contudo PMSF também inibe enzimas que apresentam cisteína no sítio ativo, como cisteíno proteases (BARRET, 1994). Inibição por PMSF foi observada para várias lipases de origem microbiana (NAWANI et al., 1998; BENDIKIENE et al., 2004; KANWAR et al., 2005; NAWANI et al., 2006; DANDAVATE et al., 2009; GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011).

Nam et al. (2009) estudaram o efeito inibitório do PMSF sobre a atividade de lipases microbianas utilizando cristalografia de raio-X para determinação estrutural das proteínas. Esses autores verificaram que o resíduo de serina da tríade catalítica e do centro sulfonil do

PMSF formam uma ligação covalente, sendo que a configuração estrutural deste complexo é semelhante à das serino-proteases.

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

Substâncias	Atividade relativa (%)			
	Lipase livre		Lipase imobilizada	
	2 mM	10 mM	2 mM	10 mM
Controle	100,0 ± 5,3	100,0 ± 7,5	100,0 ± 1,8	100,0 ± 3,8
EDTA	71,0 ± 7,6	61,1 ± 2,8	93,6 ± 6,4	106,0 ± 7,8
DTT	104,9 ± 10,7	119,3 ± 9,5	99,0 ± 2,7	124,3 ± 3,6
β-mercaptoetanol	97,0 ± 8,7	113,1 ± 5,8	98,62 ± 4,7	134,1 ± 10,8
PMSF	89,8 ± 7,7	20,5 ± 9,2	89,0 ± 0,89	23,4 ± 2,8
Tween 20	77,6 ± 9,4	45,5 ± 5,2	68,1 ± 5,1	34,3 ± 7,8
Tween 80	59,5 ± 6,6	32,4 ± 8,8	52,6 ± 2,4	22,4 ± 2,8
SDS	ND	ND	ND	ND
Deoxicolato de sódio	80,3 ± 4,7	81,8 ± 8,6	89,5 ± 5,5	93,7 ± 1,8

A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 15 U/mg prot. para a enzima livre e 13 U/mg prot. para a enzima imobilizada. ND: atividade não detectada nas condições de ensaio.

As lipases livre e imobilizada foram completamente inibidas por SDS, em ambas as concentrações avaliadas, indicando a importância fundamental das interações hidrofóbicas para a manutenção da estrutura tridimensional da enzima, e até mesmo para manutenção da ligação da enzima com o suporte. Dentre as lipases estudadas, poucas não foram

completamente inibidas na presença de SDS (BENJAMIN e PANDEY, 2001; ABBAS et al., 2002; KANAWAR et al., 2005; SALAMEH e WEIGEL, 2010; SYED et al., 2010).

Outros surfactantes como Tween 80, Tween 20 e deoxicolato de sódio, em ordem decrescente, também apresentaram efeito inibitório sobre a atividade da enzima livre e imobilizada. O efeito do Triton X-100 não foi testado porque o meio reacional já continha 0,5% de Triton X-100 em sua composição, e testes com a enzima bruta indicaram que esse detergente aumentou gradativamente a atividade lipase até 0,5% (Capítulo 3).

Castro-Ochoa et al. (2005) também observaram inibição total da lipase de *Bacillus thermoleovorans* por SDS, Tween 80 e Tween 20, mas leve aumento da atividade com 1% de Triton X-100. Guncheva et al. (2011) relataram que em concentrações elevadas o efeito dos tensoativos na atividade de lipases é negativo, provavelmente porque eles bloqueiam o acesso do substrato ao sítio ativo. Contudo, Dandavate et al. (2009) observaram ativação de uma lipase purificada de *Burkholderia multivorans* por SDS, Triton X-100, Tween 80 e deoxicolato de sódio, sendo o fato atribuído a uma alteração na conformação da enzima que aumentava a acessibilidade do substrato.

Efeitos de solventes orgânicos sobre a atividade lipase

A **Tabela 5** apresenta o efeito de solventes orgânicos sobre a estabilidade das lipases livre e imobilizada. As lipases apresentam diferentes sensibilidades a solventes, mas em geral, solventes polares miscíveis em água são mais desestabilizantes que solventes imiscíveis com água (NAWANI et al., 1998). Admite-se que solventes não polares provavelmente promovam mudanças no equilíbrio entre a conformação aberta e a fechada das lipases e também modifiquem a solubilidade do substrato e dos produtos de reação; enquanto que os solventes polares são mais desestabilizantes para a estrutura da proteína por removerem a água de solvatação da enzima (CASTRO-OCHOA et al., 2005; GUNCHEVA e ZHIRYAKOVA, 2011). Nessa tabela, os solventes estão apresentados de acordo com sua hidrofobicidade (Log *P*) que variou de -1,67 a 4,51, sendo que valores negativos indicam que o solvente é solúvel em água, enquanto que valores positivos indicam que os mesmos são insolúveis, ocorrendo a separação da fase aquosa da orgânica (SANGSTER, 1989).

Os resultados observados para a lipase de *C. viswanathii* mostraram que não houve correlação entre os valores Log *P* dos solventes e a estabilidade da enzima, a qual foi muito

estável na maioria deles, mantendo mais de 60% da atividade tanto na forma livre como imobilizada. Tal característica possibilita várias aplicações industriais desta lipase como em reações de transesterificação, síntese de ésteres e resolução de racêmicos (XU et al., 2002; DANDAVATE et al., 2009; LI et al., 2010; GUPTA et al., 2011).

A atividade da enzima livre foi levemente estimulada após a incubação de 1 h com etanol, glicerol e DMSO, atingindo os valores aproximados de 117, 110 e 108%, respectivamente. Metanol, 2-propanol e iso-octano não interferiram na atividade da enzima. A atividade enzimática permaneceu acima de 80% quando a lipase foi incubada com propilenoglicol, n-butanol, 1-propanol, acetonitrila, n-hexano e acetona, enquanto que com xilol e tolueno a atividade residual foi de 78 e 72%, respectivamente.

Os resultados obtidos com a lipase livre de *C. viswanathii* foram semelhantes aos verificados para a lipase produzida por *Rhizopus homothallicus* var. *rhizopodiformis* em solventes orgânicos (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009), que também não apresentaram correlação entre a estabilidade da lipase e os valores de Log *P* dos solventes utilizados, bem como aqueles observados para as lipases de *Acinetobacter* sp. SY-01 (HAN et al., 2003) e *Aspergillus niger* MYA 135 (ROMERO et al., 2012).

A atividade da enzima imobilizada foi moderadamente estimulada na presença de xilol, glicerol, iso-octano, 2-propanol, n-hexano e acetonitrila, sendo que as maiores ativações foram encontrados com propilenoglicol (176,1%), 1-propanol (167,7%) e DMSO (159,3%). Butanol não interferiu na atividade da enzima. A lipase imobilizada foi menos estável em metanol e etanol, apresentando até mesmo menor estabilidade que a lipase livre. O tolueno interferiu negativamente sobre ambas as formas da enzima, diminuindo ainda mais a atividade da enzima imobilizada que a da enzima livre.

Tabela 5. Efeito de solventes orgânicos sobre a atividade da lipase livre e imobilizada.

Substâncias	Log <i>P</i>	Atividade relativa (%)	
		Lipase livre	Lipase imobilizada
Controle		100,0 ± 4,1	100,0 ± 4,6
Glicerol	-1,67	110,4 ± 5,7	139,3 ± 2,4
DMSO	-1,38	108,5 ± 2,5	159,3 ± 2,9
Propilenoglicol	-0,92	90,5 ± 7,7	176,1 ± 6,8
Metanol	-0,76	104,1 ± 7,5	63,0 ± 7,0
Acetonitrila	-0,40	86,6 ± 8,2	118,4 ± 10,5
Etanol	-0,24	116,7 ± 6,1	82,2 ± 1,9
Acetona	-0,23	81,8 ± 6,8	73,4 ± 10,9
2-propanol	0,07	101,5 ± 9,8	126,8 ± 1,0
1-propanol	0,25	87,0 ± 4,3	167,5 ± 7,3
n-Butanol	0,80	88,0 ± 9,9	107,8 ± 5,0
Tolueno	2,50	72,2 ± 5,3	62,0 ± 4,0
Xilol	3,15	78,0 ± 7,4	139,9 ± 1,5
n-Hexano	3,50	86,5 ± 8,5	120,0 ± 10,7
iso-Octano	4,51	98,4 ± 7,8	135,9 ± 7,4

O experimento foi realizado adicionando-se 10% de cada solvente em tampão McIlvaine pH 4,0, por 1 h., com agitação de 150 rpm, a 10 °C, em frascos hermeticamente fechados. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 15 U/mg prot. para a enzima livre e 13 U/mg prot. para a enzima imobilizada. Log *P*: logaritmo do coeficiente de partição de um solvente particular entre *n*-octanol e água (SANGSTER, 1989).

Na literatura não foram encontrados trabalhos que comparam os efeitos de solventes sobre a atividade enzimática de lipases livres e imobilizadas. O efeito de ativação da enzima pelos solventes orgânicos, contudo, pode estar relacionado ao direcionamento da enzima no

suporte de imobilização, sendo que as interações de moléculas do solvente com a enzima facilitariam a mudança do equilíbrio para a conformação aberta.

Especificidade por substratos

As atividades hidrolíticas das lipases livre e imobilizada sobre os substratos sintéticos *p*-nitrofenil ésteres são apresentadas na **Figura 7**. A lipase de *C. viswanathii* apresentou maior atividade sobre os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, acima de 10 carbonos, com a maior atividade observada sobre o *p*-nitrofenil palmitato, tanto para a lipase livre como para a imobilizada. Níveis inferiores de atividade foram observados com acetato e butirato, bem como com estearato, sobre o qual as atividades enzimáticas reduziram-se a 50,4 e 40,0% para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

A especificidade da lipase por substratos de cadeia longa e sua hidrofobicidade parecem ser atribuídas à geometria, estrutura e tamanho do sítio ativo da enzima (PLEISS et al., 1993). Assim, lipases com especificidade para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa foram relatadas em *Pseudomonas aeruginosa* BN-1 (JI et al., 2010; SYED et al., 2010) e *Yarrowia lipolytica* (YU et al., 2007). Outras lipases foram relatadas com maior atividade sobre ésteres de cadeias carbônicas médias como as de *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (LEE et al., 1999), *Streptomyces rimosus* (LESCIC et al., 2001), *Mucor* sp. (ABBAS et al., 2002), *Burkholderia* sp. HY-10 (PARK et al., 2007) e *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 (DHEEMAN et al., 2011a). Já as lipases de *Metarrhizium ansiopliae* (SILVA et al., 2008), *Geotrichum* sp. SYBC WU-3 (CAI et al., 2009) e *C. rugosa* (LEE et al., 2011) apresentaram maior especificidade por substratos de cadeia carbônica curta C2-C8.

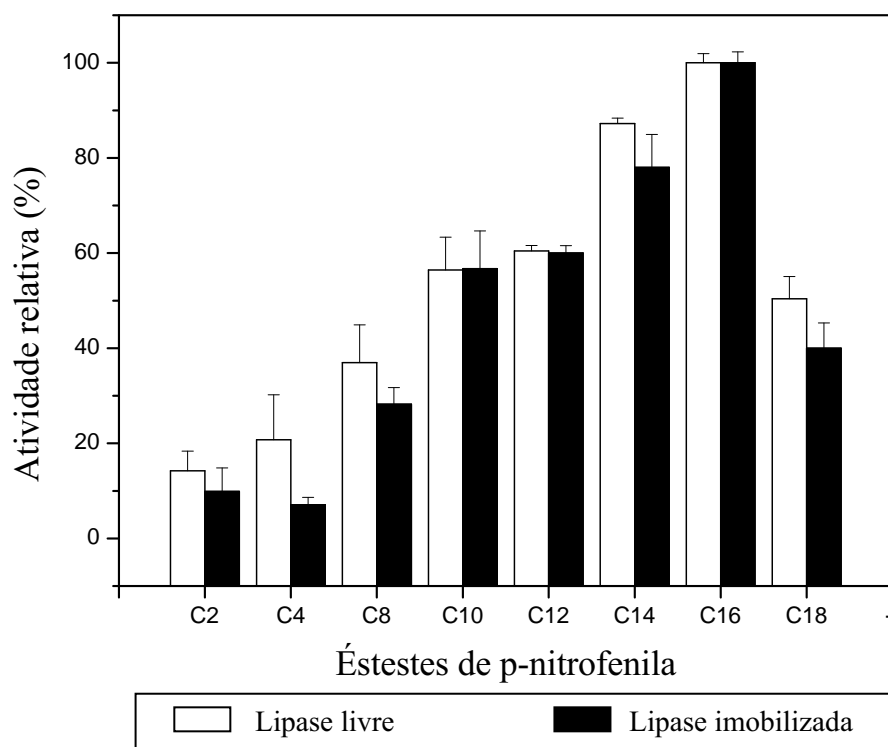


Figura 7. Atividade lipase livre e imobilizada de *C. viswanathii* sobre diferentes ésteres de ácidos carboxílicos e de *p*-nitrofenol. *p*-Nitrofenil ésteres de foram utilizados na concentração final de 0,5 mM em tampão McIlvaine pH 4,0. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C. A atividade controle (100%) correspondeu a 15 U/mg prot. para a enzima livre e 13 U/mg prot. para a enzima imobilizada. Legenda: C2 acetato, C4 butirato, C8 caproato, C10 decanoato, C12 laurato, C14 miristato, C16 palmitado, C18 estearato.

Cinética enzimática

As reações de hidrólise do substrato *p*NPP foram medidas em diferentes concentrações de substrato desde 0,0 até 1,0 mM com as enzimas livre e imobilizada. Os dados cinéticos de hidrólise do *p*NPP foram utilizados para linearização pelo gráfico duplo-recíproco (**Figura 8**), sendo determinadas as constantes de Michaelis-Menten - K_m e V_{max} . A partir desse valor foi calculado o número de renovação (k_{cat}) e a eficiência catalítica (k_{cat}/K_m) para a enzima livre (**Tabela 6**). Para a lipase livre o valor de K_m foi de 0,16 mM e V_{max} de 889,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. O valor de K_m para a enzima imobilizada foi de 0,08 mM e de V_{max} de 900,1

$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína. A imobilização reduziu o valor de K_m da enzima à metade, e aumentou a velocidade máxima. Estes resultados são muito importantes, pois indicam um aumento da afinidade da enzima pelo substrato, bem como a velocidade de catálise. Portanto, a imobilização favoreceu ainda mais a hidrólise do substrato, possivelmente devido a alguma alteração conformacional da enzima.

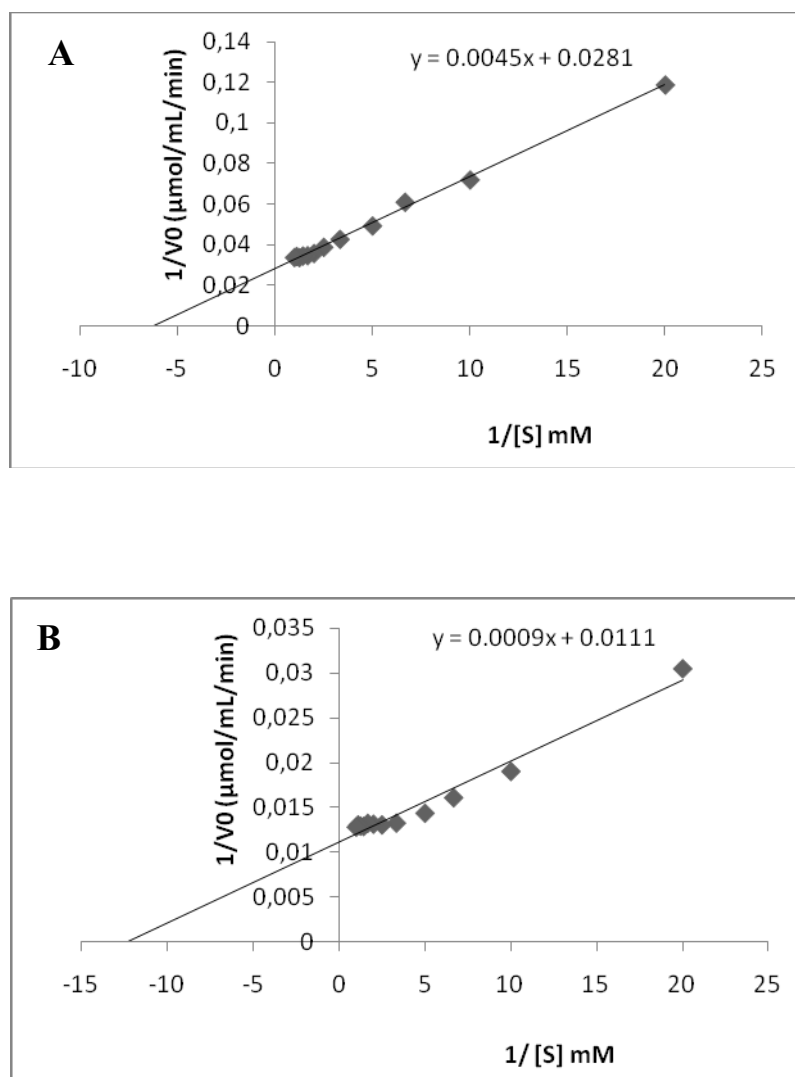


Figura 8. Cinética enzimática das lipases livre (A) e imobilizada (B) de *C. viswanathii* usando *p*-nitrofenil palmitato como substrato. A atividade foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 45 °C.

As mudanças nos valores dos parâmetros cinéticos obtidos para a lipase imobilizada de *C. viswanathii* em relação à enzima livre foram diferentes às de outras lipases imobilizadas em matrizes de outra natureza. A lipase de *C. rugosa* imobilizada em quitosana apresentou valores de K_m e V_{max} maiores que os encontrados para a enzima livre (CHIOU e WU et al., 2005). Estes resultados foram atribuídos às mudanças estruturais na enzima induzidas pelo procedimento de imobilização utilizado ou devido à menor acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada. A imobilização covalente da lipase de *C. rugosa* em suporte magnético provocou aumento do valor de K_m e redução do valor de V_{max} comparado aos da enzima livre (BAYRAMOGLU e ARICA, 2008). Estes autores relataram que os resultados estariam relacionados a uma conformação menos ativa da enzima, e ao fato de que a imobilização covalente utilizada não pode ser controlada para que a enzima assumisse uma posição adequada no suporte, além da solubilidade do substrato tributirina ainda poder interferir nos parâmetros cinéticos.

Tabela 6. Constantes cinéticas da lipase livre purificada de *C. viswanathii*.

	Parâmetros cinéticos			
	K_m	V_{max}	k_{cat}	k_{cat}/K_m
	(mM)	($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	(s^{-1})	($\text{M}^{-1}\text{ s}^{-1}$)
Lipase livre	0,16	889,6	868	$5,4 \times 10^6$
Lipase imobilizada	0,08	900,1	-	-

Os valores de k_{cat} e eficiência catalítica para a enzima livre foram 868 s^{-1} e a de $5,4 \times 10^6\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente. As lipase A e lipase B de *C. cylindracea* purificadas apresentaram valores de k_{cat} de 1010 e 1600 s^{-1} e k_{cat}/K_m de $2,5 \times 10^7$ e $0,42 \times 10^7\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente (RÚA et al., 1993). Uma lipase purificada de *Aspergillus terreus* apresentou

k_{cat} de $1,62 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ e k_{cat}/K_m de $1,90 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando trioleína como substrato (HAMDY e ABO-TAHON, 2012).

A eficiência da imobilização pode ser representada pelo fator de eficiência (η) calculado pela razão entre o valor de velocidade máxima da enzima imobilizada pelo da enzima livre ($\eta = V_{\text{imobilizada}}/V_{\text{livre}}$). A partir deste cálculo obteve-se fator de eficiência de 1,01 para a imobilização da lipase de *C. viswanathii*. Comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com outros da literatura, como aqueles obtidos para a lipase de *C. rugosa* imobilizada em suporte metálico, que apresentou fator de eficiência de 0,783 (BAYRAMOGLU e ARICA, 2008), e para a mesma enzima imobilizada em suporte de troca iônica, que apresentou fator de eficiência de 0,589 (ARICA et al., 2010), pode-se concluir que o processo de imobilização utilizado foi muito eficiente, melhorando inclusive as propriedades catalíticas da enzima, pois como citado por Bastida et al. (1998), a imobilização nesses casos poderia estabilizar a estrutura tridimensional da enzima, permitindo maior acesso do substrato ao sítio catalítico.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A lipase ácida de *C. viswanathii* foi purificada por uma estratégia simples, rápida e barata, em apenas duas etapas, uma diálise e uma cromatografia de interação hidrofóbica em octil agarose. A referida lipase foi também imobilizada por interação hidrofóbica em octil Sepharose. A análise por SDS-PAGE revelou que esta enzima apresenta massa molecular de 69 kDa, contudo tentativas de determinação dessa propriedade por cromatografia de exclusão molecular indicaram que ela forma agregados de elevada massa molecular. O estudo do reuso da enzima imobilizada mostrou excelente recuperação após quatro ciclos e 70% de atividade após o quinto ciclo. A imobilização alterou os parâmetros cinéticos da enzima, favorecendo ainda mais a catálise. A atividade ótima desta enzima em pH 4,0, tanto na forma livre quanto imobilizada, bem como a alta estabilidade em ampla faixa de pH ácido a levemente alcalino são propriedades importantes para sua aplicação em processos biotecnológicos. A estabilidade da lipase livre e imobilizada em vários solventes orgânicos polares e apolares indica que esta enzima pode ser utilizada em meio não aquoso. Além disso, a imobilização aumentou muito a estabilidade térmica a 40, 45 e 50 °C, o que também é de extrema importância operacional

para aplicações industriais, conferindo a esta enzima amplas possibilidades de futuras aplicações nesses processos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 31, p. 968–975, 2002.
- ANGKAWIDJAJA, C.; MATSUMURA, H.; KOGA, Y.; TAKANO, K.; KANAYA, S. X-ray crystallographic and md simulation studies on the mechanism of interfacial activation of a family I.3 lipase with two lids. **Journal Molecular Biology**, vol. 400, p. 82–95, 2010.
- ARICA, M. Y.; SOYDOGAN, H.; BAYRAMOGLU, G. Reversible immobilization of *Candida rugosa* lipase on fibrous polymer grafted and sulfonated p(HEMA/EGDMA) beads. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, vol. 33, p. 227–236, 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, vol.18, p. 392-416, 1996.
- BARRET, A. J. Classification of peptidases. **Methods in enzymology**, vol. 44, p. 1-15, 1994.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 58, no. 5, p. 486-493, 1998.
- BAYRAMOGLU, G.; ARICA, M. Y. Preparation of poly(glycidylmethacrylate–methylmethacrylate) magnetic beads: Application in lipase immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 55, p. 76–83, 2008.
- BENDIKIENE, V.; SURINENAITE, B.; JUODKA, B.; SAFARIKOVA, M. Insights into catalytic action mechanism of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 34, p. 572–577, 2004.
- BENJAMIN, S.; PANDEY, S. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 44, no. 2 : p. 213 – 221, 2001.
- BOUTUR, O.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Factors influencing ester synthesis catalysed in aqueous media by the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. **Journal of Biotechnology**, vol. 42, p. 23-33, 1995.
- CAI, Y.; WANGB, L.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum sp.* SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 786–790, 2009.

- CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 37, p. 648–654, 2005.
- CHAHINIAN, H.; VANOT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Production of extracellular lipases by *Penicillium cytopodium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. **Biosciences Biotechnology and Biochemical**, vol. 64, no. 2, p. 215-222, 2000.
- CHIOU, S-H.; WU, W-T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, vol. 25, p. 197–204, 2005.
- DANDEVATE, V.; JINJALA, J.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 3374–3381, 2009.
- DENG, H-T.; WANG, J-J.; LIU, Z-Y.; MA, M. Influence of varying surface hydrophobicity of chitosan membranes on the adsorption and activity of lipase. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 115, p. 1168–1175, 2010.
- DHEEMAN, D. S.; HENEHAN, G. T. M.; FRÍAS, J. M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 3373–3379, 2011a.
- DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHANA, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol.72, p. 256– 262, 2011b.
- DIMITRIJEVIC, A.; VELICKOVIC, D.; BIHELOVIC, F.; BEZBRADICA, D.; JANKOV, R.; MILOSAVIC, N. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. **Bioresource Technology**, vol. 107, p. 358–362, 2012.
- ERICSSON, D. J., KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTRÖM, A. G.; BÄCKVALL, J-E.; MOWBRAY, S. L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal Molecular Biology**, vol. 376, p. 109–119, 2008.
- FADILUĞLU, S.; SOYLEMEZ, Z. Olive oil hydrolysis by celite-immobilized *Candida rugosa* lipase. **Journal Agriculture Food Chemistry**, vol. 46, p. 3411-3414, 1998.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Self-Assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 82, no. 2, 2003.

- GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHA ABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 37, p. 34–41, 2007.
- GAO, Y.; BREUIL, C. Properties and substrate specificities of an extracellular lipase purified from *Ophiostoma piceae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol. 14, p. 21–429, 1998.
- GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus oryzae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 37, p. 34–41, 2007.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 40, p. 111–120, 2006.
- GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 68, p. 1–21, 2011.
- GUPTA, P.; UPHADHYAY, L. S. B.; SHRIVASTAVA, R. Lipase catalyzed-transesterification of vegetable oils by lipolytic bacteria. **Research Journal of Microbiology**, vol. 6, no. 3, p. 281–288, 2011.
- HAN, S-J; BACK, J. H.; YOON, M. Y.; SHIN, P. K.; CHEONG, C. S.; SUNG, M-H.; HONG, S-P.; CHUNG, I.; HAN, Y. S. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from *Acinetobacter species* SY-01. **Biochimie**, vol.85, p. 501–510, 2003.
- HAMDY H. S.; ABO-TAHON, M. A. Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. *africanus* (CBS 130.55): production, purification and characterization. **Annals of Microbiology**, 2012.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 235–251, 2006.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELA-TORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 61, p. 136–142, 2009.
- IBRIK, A.; CHAHINIAN, H.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. C. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. **Lipids**, vol. 33, n. 4, p. 377–84, 1998.
- JEGANATHAN, J.; NAKHLA, G.; BASSI, G. Hydrolytic pretreatment of oily wastewater by immobilized lipase. **Journal of Hazardous Materials**, vol.145, p. 127–135, 2007.
- JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. 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**, vol. 66, p. 264–269, 2010.

- KAEWTHONG, W.; SIRISANSANEEYAKUL, S.; PRASERTSAN, P.; H-KITTIKUN, A. Continuous production of monoacylglycerols by glycerolysis of palm olein with immobilized lipase. **Process Biochemistry**, vol. 40, p. 1525–1530, 2005.
- KANWAR, S. S.; KAUSHAL, R. K.; JAWED, A.; GUPTA, R.; CHIMNI, S. S. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: a comparative study. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, vol. 42, p. 233-237, 2005.
- KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 22, p. 275-280, 1998.
- KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. D. Extracellular Lipase of *Pseudomonas* sp. Strain ATCC 21808: Purification, Characterization, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Data **Journal of Bacteriology**, vol. 173, no. 15, p. 4836-4841, 1991.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; DASGUPTA, S. Lipase mediated isoamyl acetate synthesis in solvent-free system using vinyl acetate as acyl donor. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 47, no. 1, p. 13–18, 2009.
- KURTOVIC, I.; MARSHALL, S. N., ZHAO, X. Hydrophobic immobilization of a bile salt activated lipase from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, no. 168– 174, 2011.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, D-W.; KOH, Y-S.; KIM, K-J.; KIM, B-C.; CHOI, H-J.; KIM, K-J.; SUHARTONO, M. T.; PYUN, Y-R. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 179, p. 393-400, 1999.
- LEE, L. C.; YEN, C. C.; MALMIS, C. C.; CHEN, L. F.; CHEN, J. C.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Characterization of condo-optimized recombinant *Candida rugosa* lipase 5 (LIP 5). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 59, p. 10693-10698, 2011.
- LESCIC, I.; VUKELIC, B.; MAJERIC-ELENKOV, M., SAENGER, W.; ABRAMIC, M. Substrate specificity and effects of water-miscible solvents on the activity and stability of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technolog**, vol. 29, p. 548–553, 2001.
- LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemical**, vol. 216, p. 155-160, 1993.
- LI, J.; ZHANG, S.; LIU, G.; ZHAO, R.; XU, H.; QIAO, D.; CAO, Y. Separation and identification of lipase – producing strains and immobilized transesterification efficiency. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 4, no. 6, p. 448-453, 2010.

- LIEBETON, K.; ZACHARIAS, A.; JAEGER K-E. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. **Journal of Bacteriology**, vol. 183, no. 2, p. 597–603, 2001.
- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of the enzyme dissociation. **Journal of the American Chemistry Society**, vol. 56, p. 658-666, 1934.
- LIU, Y-C.; MARANGONI, A. G.; YADA, R. Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. **Food Research International**, vol. 31, no. 3, p. 243-248, 1998.
- LIU, Z.; CHI Z., WANG, L.; LI, JING. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 40, p. 445–451, 2008.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D.V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**, vol.100, p. 1486–1490, 2009.
- MOJOVIC, L.; KNEZEVIC, Á. Z.; POPADIC, Á. R.; JOVANOVIC, Á. S. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 50, p. 676-681, 1998.
- MONIER, M.; EL-SOKKARY, A. M. A.; SARHAN, A. A. Immobilization of *Candida ugosia* lipase on modified natural wool fibers. **Reactive & Functional Polymers**, vol. 70, p. 122–128, 2010.
- NAM, K. H.; KIM, S-J.; PRIYADARSHI, A.; KIM, S.K; HWANG, K. Y. The crystal structure of an HSL-homolog EstE5 complex with PMSF reveals a unique configuration that inhibits the nucleophile Ser144 in catalytic triads. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 389, p. 247–250, 2009.
- NAWANI, N.; DOSANJH, N. S.; KAUR, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. **Biotechnology Letters**, vol 20, no 10, p. 997–1000, 1998.
- NAWANI, N.; DOSANJH, N. S.; KAUR, J. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: Purification and characterization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol. 290, p.17–22, 2006.
- OGINO, H.; INOUE, S.; AKAGI, R.; YASUDA, M.; DOUKYU, N.; ISHIMI, K. Refolding of a recombinant organic solvent-stable lipase, which is overexpressed and forms an inclusion body, and activation with lipase-specific foldase. **Biochemical Engineering Journal**, vol.40, p. 507–511, 2008.
- ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. Immobilization of *Candida antarctica* A and *Thermomyces lanuginosus* lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 95, p. 109–114, 2009.
- PALOMO, J. M.; PENAS, M. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; PISABARRO, A. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RAMIREZ, L.; GUISÁN, J. M. Solid-

phase handling of hydrophobins: immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. **Biomacromolecules**, vol. 4, p. 204-210, 2003.

PALOMO, J. M.; SEGURA, R. L.; FERNAÁNDEZ-LORENTE, G.; PERNAS, M.; RUA, M. L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. **Biotechnology Progress**, vol. 20, p. 630-635, 2004.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, vol. 29, no. 2, p. 119-131, 1999.

PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, no. 1, p. 93-99, 2006.

PARK, D-S.; OH, H-W; HEO, S-Y.; JEONG, W-J.; SHIN, D. H. ; BAE, K. S.; PARK, H-Y. Characterization of an Extracellular Lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 Isolated from a Longicorn Beetle. **The Journal of Microbiology**, vol. 45 , no. 5, p. 409-417, 2007.

PEREZ, V. H. SILVA, G. S.; GOMES, F. M.; CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 34, p. 13–19, 2007.

PERNAS, M. A.; LÓPEZ, C.; PASTRANA, L. RÚA, M. L. Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. **Journal of Biotechnology**, vol. 84, p. 163–174, 2000.

PFEFFER . J.; RICHTER . S.; NIEVELER, J.; HANSEN, K-E.; RHLID, R. B.; SCHMID, R. D.; RUSNAK, M. High yield expression of lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 72, p. 931–938, 2006.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 93, p. 67–80, 1993.

RAMANI, K.; CHOCKALINGAM, E.; SEKARAN, G. Production of a novel extracellular acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using slaughterhouse waste as a substrate. **Journal Indian of Microbiology and Biotechnology**, vol. 37, p. 531–535, 2010.

RAMANI, K.; KARTHIKEYAN, S.; BOOPATHY, R.; KENNEDY, L. J.; MANDAL, A. B.; SEKARAN, G. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: Isotherm and kinetic studies. **Process Biochemistry**, vol. 47, p. 435–445, 2012.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 6, p.145–150, 2002.

ROMERO, C. M.; PERA, L. M.; LOTO, F.; VALLEJOS, C.; CASTRO, G.; BAIGORI, M. D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its

application in ester synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 1, p. 25–31, 2012.

RÚA, M. L.; DIAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1156, p. 181-189, 1993.

SALAMEH, M. A.; WIEGEL, J. Effects of detergents on activity, thermostability and aggregation of two alkalithermophilic lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The Open Biochemistry Journal**, vol. 4, p. 22-28, 2010.

SANI, D. G. Step up: Bacterial lipase to substitute pancreatic lipase for enzymetherapy. www.microbepundit.blogspot.com. 2006.

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

SARDA, L.; DESNUELLE, P.. Action de la lipase pancréatique sur lés esters en émulsion. **Biochimichal and Biophystry Acta**, vol. 30, p. 513–521, 1958.

SATHISH YADAV, K. N.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D. D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 10663–10670, 2011.

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

SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R. M.; GUPTA, L. K.; GUPTA, J. K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, vol. 37, p. 1075–1084, 2002.

SHARMA, K.; RATHORE, M. Comparative evaluation of specific activity of crude and partially purified lipase preparation from lipolytic bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, vol. 31-38, 2010.

SILVA, W. O. B.; SANTI, O.; BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J.A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. A. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 829–834, 2008.

SMITH, P.K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, vol. 150, p. 76-85, 1985.

SNELLMAN, E. A.; COLWELL, R. R. *Acinetobacter* lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 31, p. 391–400, 2004.

SUN, J.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; GAO, J. Immobilization of *Candida Antarctica* lipase B by adsorption in organic medium. **New Biotechnology**, vol. 27, no. 1, p. 53 – 58, 2010.

- SYED, M. N.; IQBAL, S.; BANO, S.; KHAN, A. B.; ALI-UL-QADER, S.; AZHAR, A. Purification and characterization of 60 kD lipase linked with chaperonin from *Pseudomonas aeruginosa* BN-1. **African Journal of Biotechnology**, vol. 9, no. 45, p. 7724-7732, 2010.
- VALLADAO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic prehydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, vol. 60, p. 219-225, 2007.
- VAIDYA, B. K.; SINGHAL, R. S. Use of insoluble yeast β -glucan as a support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 61, p. 101–105, 2008.
- VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 9, no.1, 2006.
- VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Tibtech**, vol. 15, p. 32-38, 1997.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 9, p. 113–148, 2000.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiology Genetic Bulletin**, vol. 13, p. 42–43, 1956.
- YAMAGUCHI, S.; TAKEUCHI, K.; MASE, T.; OIKAWA, K.; MCMULLEN, T.; DEREWENDA, U.; MCELHANEY, R.N.; KAY, C.M.; DEREWENDA, Z.S. The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono- and diglyceride specific lipase. **Protein Engineering**, vol.9, no.9, p.789-795, 1996.
- YAO, H.; ZHANGA, T.; XUE, H.; TANGA, K.; LI, R. Biomimetic affinity purification of *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Chromatography B**, vol. 879, p. 3896– 3900, 2011.
- YI, S-S.; NOH, J-M.; LEE, Y-S. Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 57, p. 123–129, 2009.
- YU, M.; LANGE, S.; RICHTER, S.; TAN, T.; SCHMID, R. D. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. **Protein Expression and Purification**, vol. 53, p. 255–263, 2007.
- YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, vol. 42, p. 384–391, 2007.
- WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 39, p. 259–264, 2006.

WU, X. Y.; EISKELIINEN, S. J.; LINKO, X-J. An investigation of crude lipases for hydrolysis, esterification, and transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 19, p. 226-231, 1996.

XU, Y.; WANG, D.; MU, X. Q.; ZHAO, G. A.; ZHANG, K. C. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 18, p. 29–37, 2002.

ZENG, H.; LIAO, K; DENG; X.; JIANG, H.; ZHANG, F. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel. **Process Biochemistry**, vol. 44, p. 791–798, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os laboratórios de Microbiologia do Centro de Estudos Ambientais – CEA e Bioquímica de Micro-organismos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Campus de Rio Claro/UNESP, vêm desenvolvendo trabalhos de pesquisa complementares ao longo de duas décadas. O primeiro se dedica a pesquisas de isolamento de micro-organismos do solo e caracterização destes quanto à produção de metabólitos intracelulares e extracelulares de interesse industrial com alto valor agregado, enquanto o segundo vem estudando estes mesmos micro-organismos quanto a produção, purificação e caracterização de enzimas de interesse biotecnológico. Dessa forma, além dos estudos realizados com as enzimas celulases, xilanases, proteases, pectinases, as lipases começaram a ser estudadas, contribuindo com o desenvolvimento de novos conhecimentos e formação de recursos humanos. Nesse sentido, esse trabalho foi planejado, e então realmente desenvolvido em ambos os laboratórios.

A primeira etapa consistiu na seleção de micro-organismos com potencial para a produção de lipase, empregando-se um método de seleção em placas com meio sólido contendo Tween 80, e meio líquido de Vogel contendo azeite de oliva. Nesta etapa, a linhagem de *C. viswanathii* destacou-se entre 90 linhagens estudadas pela maior produção de lipase em meio líquido. Nos cultivos realizados na presença de várias fontes de carbono puras, a produção desta enzima foi induzida por triacilgliceróis e ácidos graxos, sendo a maior produção observada com trioleína. As melhores condições de cultivo e produção de lipase foram obtidas com azeite de oliva (1,5% m/v); extrato de levedura (0,2% m/v), agitação de 210 rpm, pH 6,0, temperatura de 28 °C e adição de lecitina de soja (0,1% m/v), em cultivo de 72 h. Durante sua caracterização bioquímica, a lipase produzida por esta linhagem se destacou

por apresentar maior atividade em pH 3,5 e estabilidade em ambiente ácido, características incomuns entre as lipases produzidas por representantes deste gênero. Além disso, a enzima apresentou alta estabilidade em temperaturas moderadas, alta atividade hidrolítica sobre vários triacilgliceróis de origem animal e vegetal e em solventes polares.

O cultivo de *C. viswanathii* em meio sólido, utilizando farelo de trigo e bagaço de cevada para a produção de lipase, além das vantagens comuns aos processos de fermentação sólida, possibilitou a utilização de gordura de frango para a produção desta enzima, uma vez que, este resíduo formou grandes agregados nos cultivos submersos impossibilitando sua utilização pela levedura. As melhores condições de cultivo foram obtidas utilizando farelo de trigo e bagaço de cevada (1:1), gordura de frango (40%, m/m), extrato de levedura (3,5%, m/m), umidade de 40%, temperatura de 30 °C, em cultivos de 120 h. A lipase extraída desses cultivos apresentou atividade ótima em pH 5,0 e a 50 °C, uma temperatura ótima 10 °C maior e um pH ótimo 1,5 maior que a da enzima obtida por fermentação submersa. A enzima produzida por fermentação sólida também apresentou maior faixa de estabilidade ao pH, entre 2,0 e 9,0 e maior estabilidade térmica a 45 e 50 °C. Esses resultados sugerem que o cultivo de *C. viswanathii* por fermentação sólida deve ter induzido outras isoformas de lipase, além daquela produzida por fermentação submersa, nas condições utilizadas. As propriedades da enzima produzida por fermentação sólida são importantes, ampliando a aplicação de lipase de *C. viswanathii* em processos industriais, como aqueles que requerem condições ácidas, próximas da neutralidade ou alcalinas e temperaturas mais elevadas.

A lipase produzida por fermentação submersa foi purificada em duas etapas, envolvendo diálise e cromatografia de interação hidrofóbica em octil agarose, com um rendimento final de 70% e fator de purificação 19,5. Do ponto de vista industrial, essa estratégia é muito interessante, pois além de prática e rápida, também é relativamente barata, o que diminui os custos de produção.

A enzima bruta produzida por fermentação submersa foi imobilizada em resina de interação hidrofóbica octil Sepharose. O estudo do reuso da enzima imobilizada mostrou excelente recuperação da atividade após 4 ciclos e 70% de atividade após o quinto ciclo. A atividade ótima da enzima livre e imobilizada foi observada em pH 4,0 e a 45 °C.

A imobilização da lipase extracelular de *C. viswanathii* resultou em uma enzima com características muito mais interessantes que as da enzima livre para uma possível aplicação biotecnológica, como aparente ativação na faixa de pH entre 2,0 e 7,0 e maior estabilidade térmica, sendo observada atividade residual de 70% após 150 min. de incubação a 45 °C e $T_{1/2}$

de 175 min. a 50 °C, alta estabilidade e ativação em vários solventes orgânicos, sugerindo possíveis aplicações em reações de síntese, aumento da velocidade máxima (V_{\max}) e diminuição da constante de Michaelis-Menten (K_m), indicando um aumento da afinidade da enzima pelo substrato.

O crescimento de *C. viswanathii* e produção de lipase utilizando substratos hidrofóbicos, ou resíduos contendo alto teor de lipídeos, são importantes características de interesse industrial. Com isso, poderão ser desenvolvidas novas pesquisas voltadas para melhor aproveitamento da biomassa produzida por esta linhagem, otimização e ampliação das escalas de produção, purificação e imobilização desta enzima, bem como exploração de possíveis aplicações desta lipase, em reatores enzimáticos, para reações de hidrólise e síntese orgânica, bem como para tratamento de resíduos.