



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTURAS DE
TRICHOSPORON DA MICOTECA URM: SELEÇÃO,
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO
ENZIMÁTICA**

Odacy Camilo de Souza

Orientadora: Prof^a Cristina Maria Souza Motta, DO

Co-orientadora: Prof^a Keila Aparecida Moreira, DO

RECIFE

Junho/2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTURAS DE
TRICHOSPORON DA MICOTECA URM: SELEÇÃO,
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO
ENZIMÁTICA**

Componente escrito do EXAME DE DEFESA DE DOUTORADO apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Área de Concentração Fungos de Interesse Industrial

Aluna: Odacy Camilo de Souza

Orientadora: Prof^a Cristina Maria Souza Motta, DO

Co-orientadora: Prof^a Keila Aparecida Moreira, DO

RECIFE

Junho/2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Souza, Odacy Camilo de

Produção de lipases por culturas de *Trichosporon* da Micoteca URM: seleção, produção, purificação e aplicação enzimática / Odacy Camilo de Souza- Recife: O Autor, 2015.

124 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Coorientadora: Keila Aparecida Moreira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2015.

Inclui referências

1. Basidiomycota 2. Lipase 3. Biotecnologia I. Motta, Cristina Maria de Souza (orient.) II. Moreira, Keila Aparecida (coorient.) III. Título

579.59

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 448

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTURAS DE *TRICHOSPORON* DA MICOTECA
URM: SELEÇÃO, PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO ENZIMÁTICA**

ODACY CAMILO DE SOUZA

Data da defesa: 30/06/2015

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a Cristina Maria de Souza-Motta – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Cristiane Angelica Ottoni
Centro de Célula a Combustível e Hidrogênio /IPEN

Dr^a Lidiane Roberta Cruz da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UAC-Garanhus/UFRPE

Dr^a Marília de Holanda Cavalcanti Maciel
Universidade de São Paulo/USP

Dr^a Oliane Maria Correia Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco

MEMBROS SUPLENTEs

Dr. Bruno Severo Gomes
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico todo este trabalho a Deus por tudo que tem feito em minha vida, do jeito que ela é (perfeita assim). Á minha família, em especial ao meu amado esposo e aos meus filhos adorados, à minha mãe querida, irmãs e amigos de longa jornada. Á minha orientadora pelo exemplo de pessoa e de vida, a minha coorientadora pelo apoio e carinho. A todos os amigos do laboratório de pesquisa da Micoteca-URM da UFPE.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em nome do Departamento de Micologia, que propiciou condições para realização do presente trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela disponibilidade dos laboratórios. A todos que fazem parte do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto.

A Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, orientadora científica, pelo constante incentivo, paciência, sabedoria sempre demonstrados.

A Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira, pela assessoria técnico-científica, pelo carinho e conhecimentos transmitidos.

A Profa. Dra. Érika Valente de Medeiros, pela contribuição nas análises estatísticas dos resultados.

Em especial à Minelle Sousa, Cyndy Farias, Roberta Cruz, pelo apoio, incentivo e amizade mais direta durante todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas da pós-graduação em Biologia de Fungos, pelos momentos de descontração.

A Eliane Nogueira, técnica da Micoteca URM, por sua amizade, alegria, e pelo apoio, indispensáveis para realização deste trabalho.

Aos amigos da Micoteca-URM, por todos os momentos compartilhados, auxílio, carinho e paciência: Ana Regis, Bruno Severo, Jadson, Juliana Lima, Julyanna Fonseca, Luan, Marília Maciel, Rosana, Susana.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Todas as ações e todas as imaginações humanas tem em vista satisfazer as necessidades dos homens e trazer lenitivo a suas dores. Recusar esta evidência é não compreender a vida do espírito e seu progresso. Porque experimentar e desejar constituem os impulsos primários do ser...”

(Albert Einstein)

RESUMO GERAL

Trichosporon são leveduras pertencentes ao filo Basidiomycota, que se destacam na produção de lipases, dentre outras enzimas. Os objetivos deste estudo foram Selecionar, culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM, quanto à produção de lipases, através de avaliação qualitativa e quantitativa, otimizar a produção da enzima, caracterizar, pré-purificar e aplicar avaliando a capacidade de degradar efluentes de abatedouros de bovinos. Foram realizadas a reativação e autenticação das culturas através das características morfofisiológicas. Para degradação do meio rico em lipídeos, foram retirados fragmentos das culturas mantidas em SYE contidos em tubo de ensaio e transferidos para o centro da placa de Petri contendo o mesmo meio. Após sete dias de crescimento, fragmentos da cultura foram transferidos para o centro da placa de Petri com meio de cultura. As culturas foram incubadas a 28°C e 37°C, observadas durante 24, 48, 72 e 96 horas, para evidenciar a presença de halo opaco ao redor da colônia. Para determinação da capacidade lipolítica em fermentação submersa O experimento foi realizado utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo 50mL dos seguintes meios; I composto por 1% (v/v) de óleo de oliva, meio II contendo 1% (v/v) de óleo de mamona, e meio III composto por 1% (v/v) de óleo de licuri, adicionados de 0,5% (p/v) extrato de levedura e pH ajustado para 6,5. Esterilizados e inoculados e incubados a 160 rpm a 37°C por 96 horas. Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase. Otimização do meio de produção de lipases por estatística de aproximação, o meio foi preparado utilizando diferentes concentrações de nutrientes testados de acordo com os experimentos do planejamento estatístico. Os inóculos foram adicionados a cada 50 mL de meio em Erlenmeyer de 250 mL de acordo com a concepção da matriz. Os frascos foram incubados por até cinco dias em diferentes temperaturas, sob agitação em diferentes rotações. Identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipases foi realizada com base no design PB. Foram testados 11 variáveis. Para a Metodologia de superfície de resposta foram usadas as variáveis selecionadas para maior produção de lipase. Para caracterização enzimática foi avaliado o efeito e a estabilidade do pH, temperatura, íons, solventes e detergentes sobre a atividade enzimática. Na purificação foi utilizado o sistema de duas fases aquosas, com planejamento estatístico 2³, assim como a aplicação do extrato bruto. Em meio sólido, todas as culturas apresentaram crescimento, sem presença de halo de degradação, em cultivo submerso, todas as culturas apresentaram atividade. *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630, produziu 104,07 UmL. O melhor pH e temperatura para produção da enzima foram pH 10.0 e 40 °C. A purificação teve coeficiente de partição 76 e recuperação da atividade 164,71%, e o fator de purificação de 0,96. Para a aplicação a melhor taxa de degradação foi obtida com a menor concentração do extrato bruto. Primeiro relato de produção de lipases por essa espécie, e da utilização de óleo de licuri como substrato. Este micro-organismo torna-se bastante promissor para a produção de lipases produz altos níveis destas enzimas, em condições que minimizando os custos da produção.

Palavras-chave: *Trichosporon* sp., lipase, purificação, aplicação

ABSTRACT

Trichosporon yeasts are belonging to the phylum Basidiomycota, they are highlighted in lipase activity among other enzymes. The objectives of this study were to select, Trichosporon cultures kept in the URM Culture Collection, as lipase production, optimize production of the enzyme, characterize, purify and apply evaluating the ability to degrade cattle slaughterhouses wastewater. They were held reactivation and authentication of cultures through the morphological and physiological characteristics. Degradation of the lipase fragments were removed from cultures maintained in SYE contained in a test tube and transferred to the center of the petri dish containing said medium. After seven days of growth, the culture pieces were transferred to the center of the petri dish with culture medium. Cultures were incubated at 28 ° C and 37 ° C, observed for 24, 48, 72 and 96 hours, demonstrating an opaque halo around the colony. To determine the lipolytic capacity in submerged fermentation The experiment was conducted using 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50ml of the following means; I consists of 1% (v / v) olive oil, medium II containing 1% (v / v) castor oil, and medium III consists of 1% (v / v) licuri oil added 0.5% (w / v) yeast extract and pH adjusted to 6.5. Sterilized and inoculated and incubated at 160 rpm at 37 ° C for 96 hours. The spectrophotometric method was used to determine the lipase activity. Optimization of lipase production medium by statistical approach, the medium was prepared using different concentrations of nutrients tested according to the statistical design of experiments. The inocula were added to each 50 ml of medium in 250 ml Erlenmeyer according to the design of the array. The flasks were incubated for five days at different temperatures under stirring at different speeds. Identification and selection of the variables significant for lipase production was based on the design PB. 11 variables were tested. For response surface methodology were used the variables selected for increased production of lipase. For enzyme characterization, the effects and stability on pH, temperature, ions, solvents and detergents on the enzymatic activity. Purification was used in the aqueous two-phase system with statistical design 2^3 , as well as the application of the crude stratum. In a solid medium, all cultures grew without the presence of degradation halo, in submerged cultures, all cultures showed activity. Trichosporon sporotrichoides URM 6630, produced 104.07 UML. The best pH and temperature for enzyme production were pH 10.0 and 40 ° C. Purification was 76 and partition coefficient 164.71% activity recovery, and purification factor of 0.96. To implement the best degradation rate was obtained with the lowest concentration of the crude extract. First report of lipase production by this species, and use of licuri oil as substrate. This micro-organism becomes quite promising for lipase production produces high levels of these enzymes under conditions which minimize production

Keywords: *Trichosporon* sp, lipase, purification, application.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

URM	Universidade Recife de Micologia
CMI	Instituto Micológico da Commonwealth
WFCC	Federação Mundial de Coleções Culturais
WDCM	Centro Mundial de Dados para Micro-organismos
MCT	Ministério da Ciência e Tecnologia
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
CRBs	Centro de Recursos Biológicos
GRAS	Geralmente considerado como seguro
K Da	Kilo Dalton
DNA	Ácido Dexóridoribonucleico
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de Carbono
FES	Fermentação Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
EMPRAPA	Empresa
PB	Plackett-Burman
MSR	Metodologia Superfície de Resposta
SDS-PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
YES	Extrato de Levedura
BOD	Demanda bioquímica de Oxigênio
IE	Índice Enzimático
pNPP	p-nitrofenilpalmitato
EB	Extrato Bruto
HCl	Ácido clorídrico
ST	Sólidos Totais
SSV	Sólidos suspensos voláteis
O e G	Óleos e Graxas

LISTA DE FIGURAS

	Pag
Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da lipase de <i>Pseudomonas sp.</i> (Jaeger e Reetz, 1998).....	28
Figura 2 - Aspectos gerais da oliva (a) planta, (b) fruto e (c) óleo de oliva (Fonte: www.fisioterapiaquintana.blogspot.com).....	40
Figura 3 - Aspectos gerais da mamona (a) planta, (b) frutos, (c) sementes e (d) óleo (Fonte: www.agricultura.al.gov.br).....	43
Figura 4 - Aspectos gerais do licuri: (a) planta, (b) fruto, (c) amêndoa e (d) óleo (fonte: www.coopes.org.br).....	46
Figura 5 – Halo de degradação de lipídio (Tween 20) ao redor da colônia, indicando capacidade de produção de lipases por <i>Trichosporon sporotrichoides</i> URM 6630.....	61
Figura 6. Gráfico de atividade enzimática para os 12 ensaios do planejamento Plackett-Burman (PB).....	64
Figura 7 - Gráfico dos efeitos individuais para a produção das lipases em fermentação submersa por <i>T. sporotrichoides</i> URM6630 (A, Tempo de incubação; B, pH; C, Temperatura; D, Rotação; E, Tamanho do inoculo; F, óleo; G, Extrato de levedura; H, Cloreto de sódio; I, Cloreto de cálcio; J, Sulfato de amônio; L, fosfato e potássio.....	65
Figura 8 - Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a produção das lipases baseados nos resultados experimentais Plackett-Burman (PB).	66
Figura 9 – Gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a produção de lipases por <i>T. sporotrichoides</i> URM6630 (a) óleo de licuri e K ₂ HPO ₄ , (b) temperatura e K ₂ HPO ₄ , e (c) óleo de licuri e temperatura.....	69
Figura 10- Figura 10 Gráficos de pareto e de efeitos, mostrando a influência das variáveis sobre os seguintes parâmetros: (a) coeficiente de partição (K) da enzima; (b) no rendimento de recuperação da enzima; (c) aumento a pureza.....	72
Figura 11- Efeitos de pH e temperatura sobre a atividade enzimática após purificação utilizando sistema de duas fases aquosas.....	74
Figura 12- Estabilidade ao pH e à temperatura sobre a atividade enzimática Após purificação utilizando sistema de duas fases aquosas.....	75
Figura 13- Gráfico dos efeitos dos inibidores sobre a atividade lipolítica em valor percentual.....	76
Figura 14- Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a hidrólise de ácidos graxos em efluentes de abatedouro de bovinos pela lipase produzida pela fermentação submersa de <i>T. sporotrichoides</i> URM6630 em óleo de licuri.....	78
Figura 15- Gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a hidrólise de ácidos graxos livres presentes em efluentes de abatedouro de bovino, por lipases produzidas pela fermentação de <i>T. sporotrichoides</i> URM6630 em óleo de licuri.....	79

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento Plackette-Burman (PB).....	52
Tabela 2 - Total de ensaios e variáveis correspondente a cada ensaio `.....	53
Tabela 3 - Variáveis significativas utilizadas na metodologia de superfície de resposta (MSR).....	53
Tabela 4 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^3) para a purificação de lipases por sistema de duas fases aquosas	54
Tabela 5 – Análise físico-química do efluente.....	56
Tabela 6.- Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^3) para a aplicação de lipases por <i>Trichosporon sporotrichoides</i> URM 6630.....	57
Tabela 7 - Viabilidade, avaliação qualitativa e quantitativa da produção de lipase, através de fermentação submersa, por espécies de <i>Trichosporon</i> preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM.).....	59
Tabela 8 - Desenho experimental e resultados da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	68
Tabela 9 - Análise de variância da ANOVA da produção de lipases por <i>T. sporotrichoides</i> utilizando óleo de licuri como fonte de carbono.....	68
Tabela 10 - Análise físico-química do efluente.....	77

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos Gerais.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1. Coleção de culturas.....	18
3.2. Leveduras.....	19
3.3. Gênero <i>Trichosporon</i> sp.....	22
3.4. Lipídios.....	23
3.4.1 Ácidos graxos.....	23
3.4.2. Triacilgliceróis.....	24
3.4.3. Fosfolipídeos.....	24
3.4.4. Esfingolipídeos.....	24
3.5. Esteróides.....	24
3.5. Lipases.....	25
3.5.1. Estrutura e mecanismo de ação.....	27
3.5.2. Ativação interfacial.....	29
3.5.3. Aplicações das lipases.....	30
3.5.3.1. Indústria alimentar.....	30
3.5.3.2. Indústria farmacêutica.....	31
3.5.3.3. Aplicação médica.....	32
3.5.3.4. Indústria têxtil.....	33
3.5.3.5. Desengorduramento do couro.....	33
3.5.3.6. Indústria de detergentes.....	33
3.5.3.7. Indústria de papel e celulose.....	34
3.5.3.8. Produção de polímeros biodegradáveis.....	34
3.5.3.9. Produção de biodiesel.....	34
3.5.3.10. Tratamento de resíduos.....	35
3.6. Fermentação.....	36
3.6.1. Fermentação em estado sólido.....	36
3.6.2. Fermentação submersa.....	37

3.6.2.1.Substratos utilizados em fermentação submersa.....	38
3.6.2.1.1. Azeite de oliva.....	38
3.6.2.1.2. Óleo de mamona.....	41
3.6.2.1.3. Óleo de licuri.....	43
3.7. Caracterização das lipases.....	46
3.8. Otimização da produção de lipases.....	47
3.9. Purificação de lipases.....	47
3.10. Aplicação da lipase em efluentes de abatedouros de bovino.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. Micro-organismos.....	50
4.2. Reativação e autenticação taxonômica das culturas	50
4.3. Detecção lipolítica.....	51
4.4. Fermentação submersa.....	51
4.5. Atividade lipolítica.....	51
4.6. Otimização do meio de produção de lipases por estatística de aproximação.....	52
4.6.1. Meio de fermentação	52
4.6.2. Identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipases usando planejamento Plackett Burman (PB).....	52
4.6.3. Metodologia de superfície de resposta (MSR).....	53
4.7. PURIFICAÇÃO DA LIPASE EM SISTEMA DE DUAS FASES.....	54
4.7.1. Enzima.....	54
4.7.2. Preparação das fases aquosas.....	54
4.7.3. Determinação do Teor de Proteínas Totais.....	55
4.7.4. Determinação do coeficiente de partição (K).....	55
4.7.5. Determinação do rendimento da enzima (R_{EC})	55
4.7.6. Determinação do aumento da pureza da lipase (AP	55
4.8. CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES PRODUZIDAS POR <i>TRICHOSPORON SPOROTRICHOIDES</i> URM 6630.....	55
4.8.1. Efeito e estabilidade ao pH e a temperatura.....	55
4.8.3. Efeito a íons, detergentes e solventes orgânicos.....	56
4.9. APLICAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>Trichosporon sporotrichoides</i> URM 6630 EM EFLUENTES DE ABATEDOURO DE BOVINOS.....	56
4.9.1. Caracterização físico-química do efluente e aplicação do extrato enzimático bruto	56
4.9.2. Ensaios enzimáticos sobre o efluente.....	57

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1. Viabilidade e autenticação das culturas de <i>Trichosporon</i>	58
5.2. Avaliação qualitativa da produção de lipases por culturas de <i>Trichosporon</i>	61
5.3. Avaliação quantitativa da produção de lipases por culturas de <i>Trichosporon</i>	62
5.4. Otimização da produção de lipases por <i>Trichosporon sporotrichoides</i> URM 6630.....	63
5.4.1. Design Plackett-Burman (PB).....	63
5.4.1.1. Análise estatística dos componentes do meio para a produção de lipases no planejamento PB.....	63
5.4.2. Otimização das variáveis significantes usando Metodologia de superfície de resposta.....	66
5.5. PURIFICAÇÃO DA LIPASE EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS.....	70
5.5.1. Efeito do peso molecular de PEG sobre a partição de lipase.....	70
5.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	73
5.6.1. Efeito e Estabilidade da lipase ao pH e à temperatura.....	73
5.6.2. Efeito de íons metálicos, inibidores e solventes sobre atividade lipase.....	75
5.7. APLICAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR <i>T sporotrichoides</i> URM 6630 NO TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO DE BOVINOS.....	77
5.7.1. Caracterização físico-química do efluente e aplicação do extrato enzimático bruto.....	77
6. CONCLUSÃO.....	79
7. AGRADECIMENTOS.....	80
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ARTIGO.....	93

1. INTRODUÇÃO

As Coleções de culturas constituem centros de conservação de recursos genéticos e metabólicos de micro-organismos, sendo responsáveis pela coleta de organismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas, pela oferta de serviços de identificação, depósito, preservação e distribuição, além de oferecer consultoria e treinamento para formação de recursos humanos (Smith e Onions, 1994; Figueiredo, 2001; Nakasone *et al.*, 2004; Canhos *et al.*, 2006).

O principal objetivo da preservação de cepas fúngicas é a manutenção das características biológicas dos isolados. A conservação dos aspectos morfológicos, fisiológicos, genéticos e metabólicos dessas cepas é frequentemente requerida para estudos de taxonomia, perfil bioquímico, diagnóstico laboratorial e produção de substâncias de interesse comercial e industrial (Neufeld e Oliveira, 2008).

De acordo com Alexopoulos *et al.* (1996) os fungos são microrganismos eucariontes, com parede celular constituída por polissacarídeos, principalmente quitina, e também por glicoproteínas. Podem ser pluricelulares (fungos filamentosos) ou unicelulares (leveduras). As leveduras são fungos reconhecidos pela sua diversidade morfológica e bioquímica, são predominantemente unicelulares, na maioria sapróbias, algumas parasitas ou oportunistas (Lachance e Starmer, 2008). Estes micro-organismos possuem diversas aplicações, com destaque nas indústrias de alimentos e medicamentos e química (Xu *et al.*, 2012). Dentre as leveduras que tem sido amplamente testadas para aplicação biotecnológica, podemos citar as do gênero *Trichosporon* (Santos *et al.*, 2007).

Espécies de *Trichosporon* podem ser isoladas de solo, amostras de água, vegetais, aves e mamíferos. É citado como agente causador de infecções superficiais e profundas nos seres humanos, no entanto é um membro da microbiota normal da boca, pele e unhas, de animais incluindo os seres humanos (Ellner *et al.*, 1993). Este gênero de levedura tem sido largamente utilizado em processos biotecnológicos para produção de diversas enzimas como celulasas, proteases, xilanases e lipases. (Liu *et al.*, 1998; Silva-Neves *et al.*, 2006). As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3)) constituem uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases e podem ser usadas em diversos processos industriais (Reis *et al.*, 2015).

Devido à enorme variedade de micro-organismos existentes há uma grande gama de lipases com características diferenciadas de atuação. As lipases apresentam vantagens sobre os processos químicos convencionais e entre estas vantagens podemos citar a alta eficiência em condições de baixas temperaturas e pressão atmosférica; a reduzida poluição ambiental; os resíduos originados de reações enzimáticas são considerados naturais pela legislação da maioria dos países; lipases apresentam vários graus de seletividade, ao contrário dos catalisadores convencionais, gerando

menos produtos secundários e reduzindo a necessidade de purificação. (Xu, 2000; Ribeiro et al., 2011).

A produção de lipases pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o micro-organismo produtor da enzima, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a composição, temperatura e pH do meio, as condições de aeração e agitação. Lipases são produzidas por um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Hasan et al., 2006; Gonçalves, 2007; Ribeiro et al., 2011; Costa et al, 2015). Desta forma, os objetivos deste trabalho foram selecionar, produzir, purificar e aplicar lipases produzidas por culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Selecionar, culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM, quanto a produção de lipases, otimizar a produção da enzima, caracterizar, purificar e aplicar avaliando a capacidade de degradar efluentes de abatedouros de bovinos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as linhagens de *Trichosporon* estocadas sob óleo mineral na Micoteca - URM do Departamento de Micologia, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco;
- Verificar a viabilidade das culturas e realizar a autenticação taxonômica;
- Caracterizar qualitativamente e quantitativamente as culturas de *Trichosporon* quanto à capacidade lipolítica;
- Selecionar a linhagem mais promissora para o estudo das condições do processo de produção da lipase;
- Estudar as melhores condições de produção da enzima: temperatura, pH, concentrações de extrato de levedura e substrato;
- Caracterizar a enzima quanto à temperatura e pH ótimos e estabilidade a temperatura e ao pH;
- Purificar a Lipase;
- Utilizar lipases como auxiliar na degradação de efluentes dos abatedouros;
- Incorporar os resultados obtidos ao banco de dados Micoteca URM e implementar o Banco de Fungos de Interesse Biotecnológico desta Coleção.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. COLEÇÃO DE CULTURAS

Com o desenvolvimento da microbiologia, a utilização de micro-organismos em áreas relacionadas à saúde humana e animal, à agricultura e alimentação, ao saneamento e à conservação do meio ambiente, entre outras, tem alcançado papel de destaque no mundo inteiro, tornando evidente a grande importância dos microrganismos, dentre eles os fungos, para o homem (Figueiredo, 2001; Andreu *et al.*, 2005). Contudo, para o desenvolvimento dessas atividades é necessária a conservação de culturas em bom estado (Neufeld, Sarquis, 2003).

O material biológico das coleções é matéria-prima para a obtenção dos mais variados produtos biotecnológicos incluindo fármacos, alimentos, bebidas alcoólicas e ácidos orgânicos. São também utilizados no saneamento ambiental, notadamente nas práticas avançadas de biorremediação de resíduos tóxicos. Na agricultura, os micro-organismos são importantes na fixação biológica do nitrogênio e no controle biológico de pragas (Filho *et al.*, 2011).

A primeira coleção de serviço que se tem registro é a Coleção Kral, estabelecida em Praga, República Tcheca, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século XX, outras coleções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão. Estas coleções passaram por um contínuo processo de evolução, visando atender demandas especializadas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial, na biotecnologia e na engenharia genética e genômica (Canhos, 2003).

Coleções de culturas são centros de excelência de conservação *ex-situ*, que mantêm e estudam um "pool" genético para gerações futuras, oferecendo serviços fundamentais para a comunidade científica e tecnológica (Canhos *et al.*, 2006). Essas coleções podem ser classificadas como coleções de serviço, de trabalho ou institucionais. As coleções de serviço, fundamentadas na conservação e distribuição de recursos genéticos e com a finalidade de pesquisa e desenvolvimento, merecem atenção especial e contam com financiamento a longo prazo em países industrializados. Já as coleções de trabalho e as institucionais, embora também valiosas, não contam com o respaldo financeiro necessário para assegurar a sua perenidade, sendo normalmente mantidas pelo esforço individual de pesquisadores. (Canhos, 2003).

Coleções de culturas contribuem diretamente para o estudo da sistemática e da biodiversidade mundial, por manterem e preservarem culturas que são essenciais para estudos representando uma importante fonte de recursos biológicos permitindo a condução de inúmeros trabalhos científicos,

assegurando o sucesso de sua utilização em processos, principalmente, biotecnológicos (FIGUEIREDO, 2001; CANHOS, 2006).

A Coleção de Culturas - Micoteca URM (www.ufpe.br/micoteca), do Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, foi fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista. Esta coleção apresenta um acervo diversificado de fungos. A Micoteca URM está registrada no Commonwealth Mycological Institute (CMI) sob a sigla URM (University Recife Mycologia) e é filiada ao Word Federation for Culture Collections (WFCC) sob o número 604 (MICOTECA, 2015; WORLD DATA CENTER FOR MICROORGANISMS, WDCM, 2015).

Além de receber culturas de fungos para fazer parte do acervo, a Micoteca URM atende a pedidos de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de fungos, liofilização e treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia de fungos. A coleção utiliza para preservação os métodos: óleo mineral, liofilização, água destilada e ultracongelamento a -80° C. O acervo da Micoteca URM possui atualmente cerca de 20.000 culturas preservadas. As culturas do acervo pertencem aos filos, Oomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e “Deuteromycota” (Fungos anamorfos), todas identificadas ao nível de espécie e mantidas em duplicata por no mínimo dois métodos de preservação.

Os métodos de preservação de microrganismos asseguram a viabilidade, morfologia, fisiologia e genética, mantendo a cultura por longo tempo e todos com o mesmo princípio: retardar ou paralisar o metabolismo celular. Dentre estes métodos, podem ser citados o método de óleo mineral, água destilada, liofilização, nitrogênio líquido, ultracongelamento a -80°C, sílica gel, solo e repiques seriados (SMITH; ONIONS, 1994; LACAZ et al., 2002; NAKASONE et al., 2004).

No Brasil, o Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), por intermédio da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) selecionou propostas de instituições que detenham coleções de serviços de referência, em especial, coleções de culturas de micro-organismos e células, para atuarem como Centros de Recursos Biológicos (CRBs), com ações de implantação do sistema de qualidade que atenda aos critérios internacionalmente aceitos para integrar a Rede Brasileira de CRBs⁷. Além de garantir a autenticidade do material biológico, desde a sua aquisição até o fornecimento (Filho et al, 2011).

3.2. LEVEDURAS

De acordo com Alexopoulos *et al.* (1996) os fungos são micro-organismos eucariontes, com parede celular constituída por polissacarídeos, principalmente quitina e também por glicoproteínas. Podem ser pluricelulares (fungos filamentosos) ou unicelulares (leveduras). As leveduras são micro-

organismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino Fungi. São caracteristicamente esféricas ou ovais. Apresentam, assim como os fungos filamentosos, parede celular, nutrição por absorção, reprodução por esporos, entre outras. No entanto, são predominantemente unicelulares, realizam reprodução assexuada por brotamento ou fissão, não apresentam corpo de frutificação (Kurtzman e Fell, 1998).

Compreendem um grupo de microrganismo com morfologia diversa, filogeneticamente são heterogêneas e estão inseridas em várias divisões, desde os fungos mitospóricos, até os Ascomycota e Basidiomycota. Reproduzem-se sexuadamente por artrósporo ou artrósporos e assexuadamente por brotamento, ou a combinação desses processos. A macroscopia caracteriza-se pela presença de colônias com cores, texturas e formas variadas; além de apresentar em sua micromorfologia, blastoconídios. Alguns gêneros como *Trichosporon* apresentam pseudo-hifas que se fragmentam originando artrósporos (Hawksworth et al 1995, Barnett et al., 2000; Lacaz et al., 2002).

Consideradas aclorofiladas, as leveduras nutrem-se por absorção, possuem metabolismo diversificado e especialidade fisiológica o que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais. São micro-organismos capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, podendo sobreviver em diferentes condições ambientais. Na ausência de oxigênio as leveduras fermentam os hidratos de carbonos e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo úteis em processos industriais principalmente na área de alimentos. Apresentam parede celular constituída por polissacarídeos, principalmente quitina e também por glicoproteínas. Encontram-se distribuídos por toda a porção do globo terrestre, levam uma vida saprofítica ou parasitária. Desde a antiguidade, estes microrganismos constituem a base de processos industriais que envolvem fermentações, estando entre os primeiros organismos domesticados pelo homem (Kirsop & Kurtzman, 1988; Alexopoulos et al., 1996; Tornai-Lehoczki et al., 2003; Aidoo et al 2006, Araujo & Hagler, 2010).

As leveduras podem ser encontradas em diversos substratos naturais, matéria orgânica em decomposição, ar, água doce e salgada e solo. (Bentubo, 2008). Estão presentes nos sedimentos, principalmente nas camadas superiores destes, podendo estar envolvidas nos processos de decomposição, ciclagem de nutrientes e na biotransformação de compostos complexos (Madigan et al., 2004; Araujo & Hagler, 2010). Basicamente, a comunidade encontrada nos sedimentos é a mesma que está presente na coluna d'água, apresentando contagens significativamente superiores em relação a esta última (Madigan et al., 2004; Pimentel et al., 2005).

De acordo com Barnett, (2000), as leveduras são muito versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais. Devido a sua versatilidade, facilidade de cultivo, menor propensão à contaminação e por oferecerem menor risco à saúde pública, tem sido

alvo de inúmeras pesquisas direcionadas a produção de enzimas para aplicação em processos biotecnológicos (Kurtzman e Fell, 1998).

Identificar leveduras de forma rápida e confiável pode ser importante na indústria, para estabelecer precisamente as causas de contaminação indesejada, e na medicina, para o diagnóstico de certas doenças. Uma identificação rápida em certos contextos também pode ser crucial, como por exemplo, quando uma determinada levedura está sendo utilizada industrialmente ou em experimentos de laboratório.

Na natureza grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por leveduras produtoras de enzimas. Tais microorganismos representam excelente fonte de enzimas devido à facilidade de manipulação genética e a ampla diversidade bioquímica. Como é possível observar, o crescimento das leveduras ocorre principalmente em habitats onde há presença de açúcares, como frutas, flores e cascas de árvores (Trindade et al. 2001, Madigan et al., 2004).

Nesse contexto, as lipases de origem microbiana são enzimas preferidas em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica (Godfrey & West, 1996). São apropriadas para as utilidades industriais, pois podem ser identificadas de maneira rápida devido ao seu crescimento em curto tempo, por absorverem uma enorme variedade de substratos de baixo custo e apresentarem facilidade de recuperação do produto final devido à rápida separação da biomassa. (Araujo & Hagler, 2010).

As principais vantagens de se utilizar leveduras como fontes de enzimas em grande escala, quando comparadas aos fungos filamentosos, é a obtenção de elevadas concentrações de enzimas através de manipulação gênica e ajuste das condições de cultivo, fácil e rápida triagem de microorganismos produtores, ciclos de fermentação curtos, uso de meios de fermentação de baixo custo, e diversidade de enzimas que catalisam a mesma reação, possibilitando flexibilidade nas condições de uso (Reed, 1997; Silva, 2003; Xu et al., 2012).

Segundo Madigan et al., 2004, as leveduras mais estudadas quanto a aplicação em diferentes setores industriais e de importância econômica são as do gênero *Saccharomyces*, utilizadas na panificação e na produção de bebidas alcoólicas, através da fermentação. O estudo enzimático envolvendo leveduras está cada vez mais consolidado, mas novos estudos utilizando esses microorganismos são necessários para a descoberta de isolados promissores para o desenvolvimento de subprodutos como enzimas (Pimentel et al., 2005)

3.3. GÊNERO *Trichosporon* sp.

O gênero *Trichosporon* passou por uma extensa reavaliação taxonômica e atualmente, inclui 37 espécies dentre elas *T. Sporotrichoides*, *T. asahii*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin*, *T. mucoides*, *T. ovoides* e *T. loubieri*. Espécies de *Trichosporon* podem ser encontradas no solo, na água, além de fazer parte da microbiota normal da pele, unhas e mucosas do trato respiratório e gastrointestinal humano. (Liu et al., 1998; Chowdhary et al., 2004; Fagundes et al., 2008).

Este gênero não apresenta fase de reprodução sexuada, no entanto características bioquímicas indicam uma relação com a divisão Basidiomycota (Barnett et al., 2000). Taxonomicamente em relação às características macroscópicas das colônias existem diversas variações morfológicas. As colônias possuem crescimento rápido, coloração que pode variar do branco ao branco-amarelado, com textura lisa, enrugada, cerosa, globosa a aveludada. O aspecto enrugado da cultura se torna mais proeminente com o tempo, o centro elevado da colônia é típico. Sua micro-morfologia caracteriza-se pela presença abundante de blastosconídeos unicelulares de forma variada e de pseudo-hifas bem desenvolvidas. A característica mais típica é a produção de hifas hialinas septadas fragmentando-se em artroconídios unicelulares com forma prolongada, cúbica ou de barril. As espécies são diferenciadas por provas bioquímicas, como assimilação de fontes de carbono, nitrogênio e teste de uréase e moleculares (Barnett et al., 2000). São fungos aeróbios, não fermenta açúcares, mas assimilam glicose, galactose e lactose (Lacaz et al., 2002).

Durante séculos, as leveduras têm estado presentes em alimentos fermentados e bebidas, como pão, queijo, azeitonas, vinho, cerveja e cidra. Sendo a maioria das leveduras de efeito benéfico para a qualidade final desses produtos. Dentre os gêneros de leveduras de interesse biotecnológico destaca-se *Trichosporon*, onde a produção de enzimas é uma das características importantes deste gênero, que tem sido relatado como produtor de xilanases, lipases e outras enzimas (Cordeiro, 1997; Coton et al., 2006; Yan et al., 2008; Xu et al., 2012).

Considerando a extraordinária diversidade microbiana, a importância dos fungos como produtores de enzimas, o potencial das leveduras no mercado biotecnológico o número escasso relatos da produção de lipases envolvendo o gênero *Trichosporon* sp., justifica-se a busca de novas espécies deste gênero, que sejam produtoras de enzimas com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise.

3.4. LIPÍDIOS

Segundo Moraes 2008, os lipídios ou acilgliceróis, são biomoléculas que exibem uma grande variedade estrutural, não são caracterizados por algum grupo funcional comum, são gorduras e óleos que formam grande parte da biomassa terrestre. É o quarto grupo principal de moléculas da célula, não são poliméricos, mas se agregam. Estas moléculas que apresentam um maior número de ligações C-H do que os polissacáridos são substâncias apolares, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos que contêm dois ou três tipos diferentes de resíduos de ácidos graxos, sendo denominados de acordo com a posição dos resíduos em relação à molécula de glicerol (Ribeiro et al., 2011).

Alguns lipídeos estão combinados com outras classes de compostos tais como proteínas (lipoproteínas) e carboidratos (glicolipídeos). Essas moléculas se encontram distribuídas em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e nas células de gordura. Desempenham várias funções biológicas importantes no organismo, entre elas; Reserva de energia em animais e sementes oleaginosas, sendo a principal forma de armazenamento os triacilgliceróis (triglicerídeos); Armazenamento e transporte de combustível metabólico; Componente estrutural das membranas biológicas. São substratos cuja hidrólise se dá por meio de enzimas lipolíticas. Devido à sua heterogeneidade química, os lípidos podem ser incluídos nas seguintes categorias: ácidos graxos, triglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos e esteróides (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.4.1. Ácidos graxos

O ser humano é capaz de sintetizar muitos tipos de ácidos graxos, incluindo os saturados e os monoinsaturados. Os ácidos graxos poliinsaturados, no entanto, principalmente os das classes j-6 - família do ácido linoleico e j-3 - família do ácido linolênico, devem ser obtidos da dieta, pois são sintetizados apenas por vegetais. Estes ácidos graxos participam como precursores de biomoléculas importantes como as prostaglandinas, derivadas do ácido linoleico e com inúmeras funções sobre contratibilidade de músculo liso e modulação de recepção de sinal hormonal (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.4.2. Triacilgliceróis

Conhecidos como gorduras neutras, esta grande classe de lipídeos não contém grupos carregados. São ésteres do glicerol - 1,2,3-propanotriol. A hidrólise ácida dos triacilglicerídios leva aos correspondentes ácidos carboxílicos - conhecidos como ácidos graxos. Este é o grupo mais abundante de lipídeos nos seres vivos, e são compostos derivados dos ácidos carboxílicos. Este grupo é geralmente chamado de lipídeos saponificáveis, porque a reação destes com uma solução quente de hidróxido de sódio produz o correspondente sal sódico do ácido carboxílico, isto é, o sabão (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.4.3. Fosfolipídeos

Os fosfolipídeos são ésteres do glicerofosfato - um derivado fosfórico do glicerol. Um dos constituintes básicos das membranas biológicas ocorre em praticamente todos os seres vivos. Como são anfifílicos, também são capazes de formar pseudomicrofases em solução aquosa; a organização, entretanto, difere das micelas. Os fosfolipídios se ordenam em bicamadas, formando vesículas (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.4.4. Esfingolipídeos

A principal diferença entre os esfingolipídios e os fosfolipídios é o álcool no qual estes se baseiam: em vez do glicerol, eles são derivados de um amino álcool. Estes lipídeos contém 3 componentes fundamentais: um grupo polar, um ácido graxo, e uma estrutura chamada base esfingóide (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.4.5. Esteróides

Os esteróides são lipídeos de cadeia cíclica, atuam nos organismos, como hormônios e, nos humanos são secretados pelas gônadas, córtex adrenal e pela placenta. O colesterol é o esteróide mais abundante nos animais (Reda & Carneiro, 2007; Moraes, 2008; Ribeiro et al., 2011).

3.5. LIPASES

As lipases (triacylglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3)) constituem uma classe especial entre as carboxil éster hidrolases. São enzimas hidrolíticas amplamente distribuídas na natureza. Formam o grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios, "in vivo" catalisam a hidrólise total ou parcial de triacylgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), fornecendo diacylglicerol, monoacylglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol, constituindo uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Jaeger e Eggert, 2002; Diaz et al., 2006; Dimitrijevic' et al., 2012).

Estas enzimas foram descobertas por Claude Bernard, em 1856 obtidas a partir do pâncreas de animais. Há aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista Eijkmann relatou que diferentes cepas poderiam produzir e secretar as lipases e a partir de 1906, iniciaram-se os primeiros estudos sobre produção dessas enzimas utilizando-se diversos micro-organismos como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Ribeiro et al., 2011).

Atualmente as lipases podem ser obtidas de várias fontes; nos animais de origem pancreática, hepática e gástrica, nos vegetais são encontradas nos tecidos de reserva energética e nos micro-organismos. Embora a lipase mais estudada até hoje seja a pancreática a pesquisa por enzimas produzidas a partir de micro-organismos vem crescendo nos últimos anos, do ponto de vista industrial estas enzimas são mais estáveis que as extraídas de plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura, permitindo uma produção em maior escala, sendo mais facilmente expressas via clonagem em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar et al., 2000; Sharma et al., 2001; Jaeger & Eggert, 2002; Hasan et al., 2006).

Existe certa divergência entre a definição exata dos termos lipases e esterases. Entretanto, as lipases apresentam capacidade única de agir apenas na interface óleo/água. O que exclui as esterases típicas, pois essas agem em ésteres solúveis em água, ou que hidrolisam outros lipídeos (acylhydrolases, colesterol esterases, tioesterases e outras), (Carvalho et al., 2003; Saxena et al., 2003; Castro et al., 2004; Tan et al., 2004; Panda & Gowrishankar, 2005; Gonçalves, 2007; Açikel et al., 2010; Reis et al, 2015).

As lipases geralmente não requerem a presença de co-fatores, atuam em uma ampla faixa de pH, são relativamente estáveis a altas temperaturas, normalmente, mantêm sua estrutura e atividade em solventes orgânicos, apresentam larga especificidade pelo substrato, alta enantiosseletividade, regioseletividade e quimiosseletividade (Pandey et al., 1999b; Elibol & Ozer, 2002; Carvalho et al., 2003; Burkert et al., 2004; Castro et al., 2004; Contesini et al., 2009; Rigo et al., 2010).

De acordo com Ribeiro e colaboradores, 2011 além de catalisarem naturalmente reações de hidrólise, são capazes de promover reações reversas de síntese, como as reações de esterificação que acontecem quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese, ocorrendo formação de ligação éster a partir de álcool e ácido carboxílico. (Jaeger & Eggert, 2002; Carvalho et al., 2003; Pizarro & Park, 2003; Pandey et al., 2004; 1999).

As reações de transesterificação são mais importantes para processos biotecnológicos, nos quais o doador do grupo acila é um éster, já nas reações de interesterificações catalisadas por lipases, o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster. A ampla gama de reações catalisadas confere às lipases maior importância entre os biocatalisadores, devido ao seu grande potencial biotecnológico (Colen, 2006; Hasan et al., 2006; Gonçalves, 2007; Dimitrijević et al., 2012).

Devido à enorme variedade de micro-organismos existentes há uma grande gama de lipases com características diferenciadas de atuação. Além da possibilidade de se induzir a produção de lipases por alguns micro-organismos de acordo com a composição do meio fermentativo. Em geral a produção de lipases é inibida na presença de açúcares simples (glicose, frutose) ou glicerol e é estimulada por meios contendo ácidos graxos livres, óleos e gorduras ou polissacarídeos complexos (Macrae & Hammond 1985; Reis et al, 2015).

Atualmente fontes de carbono têm sido estudadas pois existe um interesse expressivo em otimizar estas fontes durante a produção de lipase e também em encontrar alternativas economicamente mais atrativas. As lipases têm encontrado aplicações promissoras em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, de detergentes, na biotransformação de óleos e gorduras, obtenção de fármacos, tratamento biológico de águas residuárias, aceleração da biodegradação de polímeros. Hidrocarbonetos de petróleo têm sido mencionados como substratos potenciais para a produção microbiana de várias enzimas comerciais importantes e metabólitos secundários (Hasan et al., 2006; Gonçalves, 2007; Ribeiro et al., 2011).

Entre as vantagens que o uso de lipases apresenta sobre os processos químicos convencionais estão; alta eficiência em condições de baixas temperaturas e pressão atmosférica; reduzida poluição ambiental; produtos originados de reações enzimáticas são considerados naturais pela legislação da maioria dos países; lipases apresentam vários graus de seletividade, ao contrário dos catalisadores convencionais, gerando menos produtos secundários e reduzindo a necessidade de purificação. (Xu, 2000; Ribeiro et al., 2011).

A produção de lipases pode ser influenciada por diferentes variáveis, como o micro-organismo produtor da enzima, as fontes de carbono e nitrogênio, a concentração de oxigênio dissolvido, a composição, temperatura e pH do meio, as condições de aeração e agitação e até

mesmo a geometria do biorreator. Lipases são produzidas por um grande número de microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Hasan et al., 2006; Gonçalves, 2007; Ribeiro et al., 2011).

A maioria das lipases microbianas industriais são derivadas de fungos. Diversos gêneros de fungos demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. As enzimas obtidas dos fungos são especialmente valorizadas por não serem nocivas à saúde humana, reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe). Por exemplo, lipases de *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, e da levedura *Candida rugosa* estão sendo comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltda., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivo em preparações digestivas e para síntese quiral (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

Considerando a extraordinária diversidade microbiana e a importância dos fungos como produtores de enzimas, justifica-se a busca de novos biocatalisadores com características especiais e passíveis de aplicação em biocatálise (Gandhi, 1997; Dimitrijevic' et al., 2012).

3.5.1. Estrutura e mecanismo de ação

Desde 1990, muitas estruturas de lipases foram determinadas, sendo todas de origem microbiana. Dados importantes relacionados com a conformação da molécula puderam ser revelados com a aplicação de técnica de cristalografia e raio X (Oliveira, 2000; Saxena et al., 2003). Essas enzimas apresentam estruturas protéicas variáveis, mas todas apresentam como característica padrão uma massa molar variando entre 19 e 75k Da, exibindo um padrão de dobramento característico, conhecido como estrutura de dobramento α/β hidrolase, sendo que muitas estruturas destas enzimas já foram definidas. As lipases microbianas são glicoproteínas e apresentam em torno de 258 e 544 resíduos de aminoácidos, dos quais a maior parte são hidrofóbicos e responsáveis pela interação entre a enzima e os substratos insolúveis em água, seu sítio ativo é composto por uma folha β pregueada formada por 8 segmentos β ($\beta 1 - \beta 8$), conectadas, interligadas e envolvidas por α -hélices (Figura 1). O sítio ativo é composto por uma tríade catalítica formada pelos aminoácidos serina, histidina e aspartato (ou glutamato). O resíduo serina é responsável pela catalise e encontra-se ligado por ligações de hidrogênio ao resíduo histinina, que por sua vez encontra-se ligado a um resíduo carboxilado (aspartato ou glutamato) (Jaeger & Reetz, 1998; Carvalho et al., 2003; Castro et al., 2004; Messia et al., 2011).

A estrutura molecular atribuída às lipases preenche os requisitos estruturais de uma enzima que é solúvel em meio aquoso, ativa na interface água-óleo e hidrolisa substratos hidrofóbicos. A hidrólise do substrato ocorre em duas etapas. Inicia-se com o ataque pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo de serina nucleofílico no carbono carbonílico da ligação éster, ocorrendo a formação de um intermediário tetraédrico. Observa-se em todas essas enzimas a ocorrência da fenda do oxiânion que estabiliza o estado de transição, onde os intermediários tetraédricos são formados. Na próxima etapa, um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado com a liberação dos ácidos graxos e regeneração da enzima (Jaeger & Reetz 1999; Carvalho et al., 2003; Saxena et al., 2003b; Castro et al., 2004; Reis et al., 2009; Reis et al., 2015).

Atividade da enzima ocorre na faixa de pH entre 4 a 9 e temperatura que varia entre 25 e 70°C. As lipases microbianas são as que possuem maior estabilidade térmica (Jaeger & Reetz, 1998; Carvalho et al., 2003; Castro et al., 2004). No entanto, não existe um protocolo padrão para determinar a termoestabilidade das lipases microbianas, o que dificulta a comparação entre elas (Messia et al., 2011).

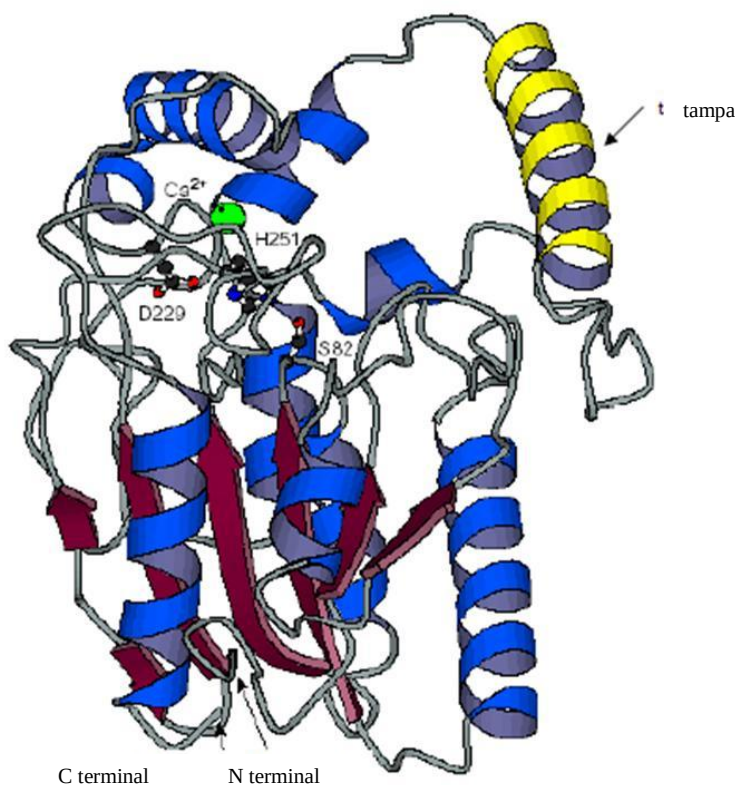


Figura. 1 Representação esquemática da estrutura da lipase de *Pseudomonas* sp. (Jaeger e Reetz, 1998).

3.5.2. Ativação interfacial

Lipase, uma carboxiesterase, diferentemente das esterases, atuam em substratos emulsificados. Mesmo sendo solúveis em água, as lipases catalisam reações hidrolíticas de triglicerídeos insolúveis, pois agem na interface de sistemas bifásicos óleo/água. Estas enzimas, portanto, não obedecem às equações de cinética enzimática de Michaelis-Menten, que são válidas apenas se a reação catalítica ocorrer em fase homogênea. Dessa forma, a análise das reações catalisadas por lipases ocorre utilizando-se substrato lipídico sob a forma de emulsão (Saxena et al., 2003b; Castro et al., 2004; Reis et al., 2009;).

O fenômeno de ativação interfacial, originado a partir de estudos cinéticos de reações lipolíticas, relaciona o aumento da atividade da lipase com a presença de uma interface óleo/água mantida sob a forma de emulsão ou micelas. A velocidade de reação é determinada pela área superficial da emulsão, e não apenas pela concentração de lipídeos na emulsão. Somente em emulsões óleo/água bem dispersas, homogêneas e estabilizadas as determinações de atividade lipásica fornecem resultados satisfatórios (Jaeger & Reetz, 1998; Elibol & Ozer, 2002; Reis et al, 2015).

O sítio ativo da lipase é coberto por uma superfície entrelaçada chamada de “tampa” com características hidrofóbicas, uma estrutura helicoidal, que, em ausência de interface óleo/água, deixa o sítio ativo inacessível ao substrato. Com a ligação do substrato à superfície da enzima, essa tampa move-se, abrindo a enzima. Dessa forma, o sítio ativo torna-se prontamente acessível ao substrato, expondo uma área hidrofóbica significativa para a interação da lipase com a interface lipídica. Esse mecanismo explica o fenômeno de ativação interfacial (Jaeger & Reetz, 1998; Elibol & Ozer, 2002; Castro et al., 2004; Gonçalves, 2007; Reis et al., 2009).

No entanto, a presença da tampa não está necessariamente relacionada à ativação interfacial. Tendo sido descritas lipases como as de *Pseudomonas aeruginosa*, e *Candida antartica* B, que não demonstraram ativação interfacial, embora possuíssem uma “tampa” cobrindo seus sítios ativos. Assim sendo, a presença de uma “tampa” e a ativação interfacial não são critérios convenientes para classificar uma enzima como lipase. Segundo Jaeger & Reetz (1998) e Castro et al. (2004), a definição cabível às lipases é: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilglicerol de cadeia longa.

Atualmente, com o auxílio da biofísica, da cristalografia e da modelagem molecular tem crescido o número de pesquisas e o grau de conhecimento acerca da caracterização estrutural e da elucidação do mecanismo de ação das lipases, do aprimoramento de suas propriedades

enantiosseletivas, assim como da clonagem e da expressão de genes de lipases em organismos de fácil cultivo (Freire & Castilho, 2008).

3.5.3. Aplicações das Lipases

Lipases fúngicas constituem um importante grupo de enzimas biotecnologicamente importantes devido a versatilidade de suas propriedades e facilidade de produção em massa. São enzimas versáteis em suas propriedades enzimáticas e pela especificidade de substrato, o que torna muito atraente para aplicações industriais. Tais enzimas também podem ser produzidas através da tecnologia de DNA recombinante (Salah et al., 2007; Juntachai et al., 2011).

A versatilidade das lipases em catalisar a hidrólise de ésteres e reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, amplia consideravelmente as aplicações comerciais e tecnológicas destas enzimas. Por isso, podem ser aplicadas na indústria de alimentos, oleoquímica, farmacêutica, de química fina, de cosméticos, de polpa e papel, de couro, de biossensores e no tratamento de efluentes ricos em óleos e gorduras (Gandhi, 1997; Pandey et al., 2004).

Essas enzimas são utilizados de duas formas distintas; como catalisador biológico para a fabricação de ingredientes alimentares e na produção de produtos químicos finos (Dalmau et al., 2000; Singh et al., 2012).

As lipases são comumente utilizadas na transformação de óleos e gorduras, processamento de alimentos, couro, têxteis, detergentes e nas formulações de desengordurantes, fabricação de papel, síntese de produtos de química fina, a produção de produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros. Lipases também podem ser usadas para acelerar a degradação de resíduos gordos e de poliuretano (Cai et al., 2009).

3.5.3.1. Indústria Alimentícia

Visando conferir ou modificar propriedades organolépticas dos alimentos, tais como aroma, textura e digestibilidade, as lipases são amplamente utilizadas na indústria alimentícia. Segundo, Chen et al. 2008, a Companhia americana Rohm and Haas, fabrica lipases B, que é utilizada para melhorar o sabor de queijo. A adição de lipase de *Candida lipolytica* melhora a qualidade do queijo à base de leite, homogenizado e pasteurizado. Através de lipase produzida por *Rhizopus niveus*, foi desenvolvido um novo sistema de expressão para a produção recombinante de lipase na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, esta lipase incorpora especificamente o ácido esteárico nas posições sn-1 e sn-3 posições de triglicéridos no óleo de girassol. Lipase imobilizada

produzida por *Rhizomucor miehei*, é utilizada para diminuir as gorduras da manteiga de cacau, esta enzima realiza a reação de transesterificação substituindo ácidos palmítico em óleo de palma com ácido esteárico para produzir triglicérides esteárico-oléico-esteárico. As lipases também são aplicadas na produção de margarinas por meio da interesterificação de um óleo e devido à mistura de ácidos graxos saturados com insaturados nos triglicérides resultantes fornecem um produto com a textura desejada a uma margarina de boa qualidade, com o espalhamento eficaz em temperatura de refrigeração além da cremosidade (Peters & Nelson, 1951; Kohno et al., 1999; Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010; Kar et al., 2012). Lipases produzidas a partir de *Rhizomucor miehei* são usados durante o processamento do chá preto, os lipídeos da membrana vegetal são degradados pela ação enzimática, formando produtos voláteis que conferem ao produto propriedades de sabor característica, melhorando o sabor do chá (Kohno et al., 1999).

No Japão a companhia Tanabe Seiyaku, usa lipases para reforçar sabores de produtos lácteos, leite, queijo, manteiga. Lipases imobilizadas a partir de *Candida antarctica*, *Candida cylindracea* AY30 e *Geotrichum candidum* são utilizadas para a esterificação de fenóis funcionalizados para a produção de anti-oxidantes lipofílicos em óleo de girassol. Essas enzimas facilitam a remoção de gordura de produtos de carne e peixe (Kwon et al., 2002; Hasan et al., 2006).

Na indústria de laticínios, as lipases são empregadas na aceleração do processo de maturação de queijos e na hidrólise da gordura do leite. A demanda crescente por leite e derivados com menor teor de gordura tem obrigado o setor industrial a encontrar alternativas na fabricação desses produtos, dessa forma, a lipase tem sido utilizada na hidrólise seletiva dessa gordura. Adição desses hidrolisados, confere uma variedade de efeitos organolépticos aos alimentos (Virto et al., 2003).

As lipases também são utilizadas na indústria de panificação, onde se utiliza a lipase 1,3 específica cuja função é degradar os lipídeos do trigo, modificando sua interação com o glúten para obter efeito condicionador da massa, aumentando o volume do pão, conferindo uma textura do miolo e melhorando a cor branca (Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006; Singh et al., 2012).

3.5.3.2. Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica, a enzima oferece diversas vantagens; capacidade de lipases para a resolução de misturas racêmicas por síntese de um enantiômero simples são atualmente explorados para a produção de medicamentos pela indústria farmacêutica, sendo utilizadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (Patel, 2002; Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006).

Berrobi et al. 1970, desenvolveram uma patente para preparações farmacêuticas que contem as enzimas hialuronidase e thiomucase além de lipases para uso em inflamações da pele. A enzima também é utilizada na área de alimentação parenteral e enteral, onde emulsões com lipídeos estruturados têm sido vista como alternativa aos óleos vegetais utilizados tradicionalmente (Foresti & Ferreira, 2010).

As lipases são ferramentas de análises bioquímicas para diagnósticos, onde os níveis crescentes dessas enzimas no soro sanguíneo indicam a possibilidade de determinadas doenças, coração, lesão pancreática e pancreatite aguda. Funcionam como biossensores lipídicos determinando triglicéridos e colesterol no sangue (Carvalho et al., 2003; Yazawa et al., 2012).

Alguns ácidos graxos poliinsaturados tornaram-se substâncias farmacêuticas potenciais, dentre eles o ácido linoléico (ômega 6) e o ácido linolênico (ômega 3) são chamados, particularmente, de ácidos graxos essenciais, por serem obtidos somente a partir da dieta. Esses ácidos formam um importante grupo de compostos da dieta humana, uma vez que participam da prevenção de doenças cardiovasculares e inflamatórias (Pandey et al., 2004; Freitas et al., 2007; Padilha & Augusto-Ruiz, 2007; Foresti & Ferreira, 2010; Singh et al., 2012).

Lipases tem potencial de aplicação em cosméticos devido à suas atividades em surfactantes e na produção de aroma. Mono e diglicerois são produzidos por esterificação de glicerol e são usados como um agente tensioactivo na indústria de cosméticos e perfumes, utilizado como emoliente em produtos de cuidados pessoais, tais como a pele, cremes para bronzeados e óleos de banho. As lipases são empregadas em produtos auxiliares no tratamento da celulite, juntamente com a enzima hialuronidase (Xu 2000; Ciafardini et al., 2006).

Algumas patentes, relacionadas ao uso de lipase em cosméticos, já foram depositadas. Destacam-se: a patente depositada pela empresa detentora da marca L'oreal, em 1994, em que a lipase é associada a ésteres C2-25 como despigmentante; a patente depositada pela empresa detentora da marca Yves Rocher, em 1994, em que a lipase é destinada para uso capilar no tratamento da seborréia; e a patente depositada, também, pela empresa detentora da marca L'oreal, em 2000, sendo a lipase utilizada como precursor de vitamina (Faria, 2010).

3.5.3.3. Aplicação Médica

Em aplicações médicas é a principal enzima com atuação no metabolismo de gorduras. Sua deficiência coloca sérias consequências para a saúde. Também é utilizada no tratamento de tumores malignos, sendo um ativador do factor de necrose do tumor. Outras aplicações terapêuticas de

lipases é tratamento de dispepsias, perturbações gastrointestinais, manifestações cutâneas de alergias digestivas (Gandhi, 1997; Pandey et al., 2004; Yazawa et al., 2012).

3.5.3.4. Indústria Têxtil

O uso de lipase fúngica na indústria têxtil torna-se cada vez mais importante. As lipases são utilizadas para auxiliar na remoção de lubrificantes de modo a proporcionar uma capacidade elevada de absorção do tecido melhorando o nivelamento da tintura, também é utilizada nos sistemas de abrasão do denim. As preparações comerciais contendo lipases promovem a desengomagem de tecidos de algodão, reduzindo a frequência das fendas e estrias nos tecidos (Dalmau et al., 2000; Hasan et al., 2006; Trodler et al., 2008; Singh et al., 2012).

3.5.3.5. Desengordurante do couro

Desengorduramento é um passo essencial na fabricação de acessórios e roupas de couro. Neste processo, ocorre a remoção do excesso de gorduras naturais de peles oleosas. A presença da gordura provoca diversas irregularidades no acabamento. Lipases produzidas por *Rhizopus nodosus* são muito eficazes no desengorduramento de peles de ovinos, conferindo qualidade ao produto final (Gandhi, 1997; Pandey et al., 2004; Hasan et al., 2006; Singh et al., 2012).

3.5.3.6. Indústria de Detergentes

O campo comercialmente mais importante para as lipases hidrolíticas de fungos é a indústria de detergentes industriais ou domésticos. As lipases para detergentes devem possuir características de baixa especificidade ao substrato, hidrolisando gorduras de várias composições, e serem ativas e estáveis em condições normalmente consideradas agressivas para uma enzima, como temperaturas de 40 a 60 °C, presença de detergentes e meios muito básicos (Sharma et al., 2001; Hughes et al., 2012).

As lipase podem reduzir a quantidade de detergente liberada no ambiente além de poupar energia, permitindo uma menor temperatura de lavagem. O marco na utilização de lipase em detergentes ocorreu com o produto Lipolase® (lipase de *Humicola lanuginosa*) da empresa Novo Nordisk, em 1994. Em 1995, foi lançada a Lipolase Ultra® que apresentava maior capacidade de

remoção de gorduras. A versão LipoPrime®, lançada dez anos após a Lipolase®, garantia remoção, em um único ciclo de lavagem, de manchas gordurosas. Diversos fungos como *Aspergillus oryzae*, *Candida* sp., *Rhizopus oryzae*, e *Humicola lanuginosa* são conhecidos por produzir lipases em condições adequadas para aplicações em detergentes. Lipases fúngicas funcionam dissolvendo as manchas gordurosas e removendo nódulos dos tecidos, sendo componentes importantes de misturas de detergentes (Jaeger & Reetz, 1998; Pandey et al., 1999; Castro et al., 2004; Hasan et al., 2006; Nunes et al., 2012).

3.5.3.7. Indústria de Papel e Celulose

Lipases produzidas a partir de *Candida rugosa* e de *C. cylindracea* são utilizados na indústria de celulose e papel, onde preparações contendo lipases são utilizadas para controle de depósitos de resinas, removendo componentes hidrofóbicos presentes na suspensão de pasta mecânica, que causam problemas durante a fabricação do papel (Kontkanen et al., 2004; Idris et al., 2012).

3.5.3.8. Produção de polímeros biodegradáveis

As lipases são usadas como biocatalisadoras para a produção de compostos biodegradáveis úteis. Entre os compostos biodegradáveis produzidos com auxílio de lipases estão os Ésteres de trimetilpropano, similarmente sintetizados como lubrificantes, 1-Butil oleato é sintetizado por esterificação direta de butanol e de ácido oleico para reduzir a viscosidade do biodiesel no uso durante o inverno. Temos ainda os poliésteres aromáticos, biodegradáveis e produzidos por biocatálise usando lipase (Palekar et al., 2000; Pandey et al., 2004; Koblitiz & Pastore 2006; Idris et al., 2012).

3.5.3.9. Produção de biodiesel

As possibilidades de aplicações das lipases na indústria oleoquímica são enormes. O biodiesel é uma fonte renovável de energia, é biodegradável e apresenta baixo índice de emissão de partículas e de gases como CO, CO₂. Foram realizadas as produções de biodiesel catalisadas por lipases a partir de diferentes tipos de óleos, tais como de girassol, de soja, de coco, de palma e de macaúba (Ribeiro et al., 2011).

Pandey et al. 2002, relataram a metanólise de uma mistura de óleo de resíduos utilizando lipase imobilizada de *Candida antarctica*. A utilização de lipases de *Mucor miehei* e *Candida antarctica* na transesterificação de óleos usando diferentes tipos de hexano como solvente mostrou que a lipase de *M. miehei* é mais eficiente na conversão de álcoois primários (metanol, etanol, propanol e 1-butanol), com rendimentos entre 95% e 98%, ao passo que a lipase de *C. antarctica* é mais adequado para a conversão de álcoois secundários (isopropanol e 2-butanol), com rendimentos entre 61% e 84% (Ribeiro et al., 2011; Hughes et al., 2012).

Na transesterificação enzimática, rendimentos mais elevados de biodiesel são atingidos utilizando óleo refinado em comparação com óleos crus. Isto é devido à presença de fosfolípidos no óleo não refinado, que afetam a interação entre o substrato e a lipase. Logo, efetua-se antes reações de transesterificação, a fim de obter uma melhor produção de biodiesel (Pandey et al., 1999; Pizarro & Park, 2003; Pandey et al., 2004; Maria et al., 2005; Salah et al., 2007; Trodler et al., 2008; Talukder et al., 2010; Sorour et al., 2012).

3.5.3.10. Tratamento de resíduos

Um novo e crescente campo de atuação das lipases refere-se ao tratamento de resíduos. Muitos estudos estão sendo realizados para a utilização de lipases no tratamento de efluentes como uma alternativa ou complemento aos tratamentos convencionais. Resíduos industriais ricos em óleos e materiais graxos provenientes de restaurantes, laticínios e indústrias processadoras de carne podem ser tratados através do uso de lipases de diferentes origens. Diversos tipos de lipases já foram testados quanto a essa capacidade. Lipase de *Pseudomonas aeruginosa* foi testada no pré-tratamento de efluentes de restaurantes e a de *Candida rugosa*, empregada no tratamento de resíduos domésticos (Ribeiro et al., 2011; Hughes et al., 2012).

Leal et al. 2002, relataram tratamento anaeróbio de esgoto sintético utilizando leite com e sem pré-hidrólise com preparação de enzima sólida de *Penicillium restrictum*. Verificaram que o desempenho do tratamento anaeróbio de águas residuais, com e sem pré-hidrólise são quase comparáveis quando a concentração de óleo e gordura com uma concentração de 600 mg L⁻¹. No entanto, quando a concentração é de 1,000 mg L⁻¹, o tratamento de águas residuais complementado com hidrólise enzimática promoveu uma ligeira melhoria no efluente hidrolisado. Rigo e colaboradores 2010 realizaram uma comparação entre a preparação não comercial de lipase de *Penicillium restrictum* produzida através da fermentação em estado sólido e uma enzima comercial (100T Lipolase - lipase imobilizada da Novozymes) na hidrólise de óleos e graxas nos efluentes de

indústria de carne de suíno. Os autores afirmaram que a preparação não comercial da lipase é mais adequada para a hidrólise de efluentes da indústria de carne devido a maiores taxas hidrolíticas. Apresentando ainda baixo custo, uma vez que o extrato enzimático bruto foi produzido a partir de resíduos agro-industriais. Espécies de fungos são usadas para degradar os derramamentos de petróleo em ambientes costeiros, o que pode melhorar a eco-restauração (Maria et al., 2005; Ribeiro et al., 2011; Junior et al., 2012; Singh et al., 2012).

O tratamento enzimático de efluentes é interessante, pois ajuda a melhorar a eficiência dos tratamentos convencionais. Além disso, as enzimas atuam em poluentes específicos e, com os avanços da biotecnologia, algumas enzimas podem ser produzidas de forma econômica. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam a utilização de preparados enzimáticos obtidos por fermentação uma alternativa de baixo custo para o tratamento de efluentes com elevados teores de gordura gerados na indústria de um modo geral (Gandhi, 1997; Pizarro & Park, 2003; Hughes et al., 2012).

3.6. PRODUÇÃO DE LIPASE

A produção de lipases pode ser realizada por dois tipos de processos: a fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) (Martins, 2001). A FS consiste no crescimento do micro-organismo sobre um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, sendo este o processo mais utilizado para a produção de lipases (Reguly, 2000; Alonso, 2001; Martins, 2001; Romero et al., 2012).

3.6.1. Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia adequada à produção de enzimas, uma vez que este processo pode ser realizado *in situ*, os substratos geralmente apresentam baixo custo, dado ao reaproveitamento de resíduos agroindustriais que podem ser empregados como fonte de nutrientes para o processo fermentativo (Martins et al., 2008; Messias et al., 2011).

Podemos citar como vantagens da técnica em relação à fermentação submersa: o uso de equipamentos menos complexos, a utilização de biorreatores mais compactos devido ao pouco volume de água, pouco espaço necessário para a fermentação, meios de cultura mais simples, baixa demanda de energia, e proporcionam baixo risco de contaminação no processo fermentativo, baixo

custo operacional e em alguns casos apresenta rendimentos superiores (Pinheiro, 2006; Reis et al, 2015).

Como limitações do processo, podemos mencionar o fato de que poucos micro-organismos são capazes de crescer em condições restritas de água, dificuldade no controle e monitoramento de parâmetros operacionais, não homogeneidade do meio de cultivo e na limitação de transferência de massa. Existe também a dificuldade de extração de produtos em meio sólido. Essa recuperação é essencial para a viabilidade do processo (Pandey et al., 2004; Martins et al., 2008; Messias et al., 2011).

3.6.2. Fermentação Submersa

As enzimas de interesse industrial, em especial as lipases, têm sido produzidas principalmente por culturas líquidas submersas. As fermentações submersas apresentam grande homogeneidade e, conseqüentemente, eficiente transferência de nutrientes, principalmente quando o substrato utilizado é um triglicerídeo (Ribeiro et al., 2011). Os aspectos de engenharia dominados e desenvolvidos na fermentação submersa estão associados ao crescimento microbiano assim como, às variações da composição e condições do cultivo (Messias et al., 2011; Romero et al., 2012; Reis et al, 2015).

Os processos de FS foram ampliados mundialmente com a produção de antibióticos, devido à importância da penicilina durante a segunda guerra mundial, tendo sido realizadas inúmeras pesquisas a fim de conhecer a cinética destes processos, os dados de dimensionamento e controle de biorreatores (Pandey, 2000).

A fermentação submersa tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis. Esse processo apresenta variáveis na forma de condução podendo ser contínuo, descontínuo e semi-contínuo (Martins, 2001).

No processo contínuo há um fluxo ininterrupto de entrada de substrato e saída de caldo fermentado conforme as necessidades do micro-organismo; já os processos descontínuos são conduzidos na forma de batelada, isto é, o meio de cultura é inoculado com o micro-organismo e o processo segue até o esgotamento de nutrientes e/ou acúmulo do produto de interesse (Montesinos et al., 1996).

O processo semi-contínuo consiste na alimentação do reator durante o processo, visando o aumento da produção e permitindo o estudo dos aspectos cinéticos do processo (Pinheiro, 2006; Romero et al., 2012).

A produção de lipases por FS pode ser realizada em “frascos” agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Esse tipo de fermentação propicia uma homogeneidade do sistema que possibilita transferência de calor mais eficiente e a facilidade de controlar parâmetros como pH, temperatura e oxigenação, garantindo o máximo de rendimento no decorrer do processo (Borzani et al., 2001; Romero et al., 2012). Nesse sistema de produção, os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio submerso tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelo micro-organismo (Reguly, 2000).

Castilho et al. (2000), ao estudar *Penicillium restrictum* em FS e FES, verificaram que a fermentação submersa requer um maior investimento quando comparado com a fermentação em estado sólido. Economicamente mais atrativa e devido a utilização de resíduos agroindustriais como substrato. A questão da viabilidade econômica da FS frente à FES vem sendo solucionada com a otimização do meio de cultivo através de novas fontes de substratos, mas também nos parâmetros utilizados durante o processo da FS como temperatura, aeração, pressão e agitação (Crueger & Crueger, 1993; Romero et al., 2012).

Segundo Trevan et al. (1990), para o sucesso da realização da FS, deve-se principalmente selecionar um micro-organismo adequado, pelo fato de que a idade da cultura pode interferir na produção, pois as culturas jovens são mais produtivas. Outros fatores como a temperatura de armazenamento dos esporos e a composição do meio de esporulação também influenciam na produção. Na produção de lipases a partir de fungos, os substratos lipídicos atuam como indutores em muitas espécies, nos quais as lipases são produzidas constitutivamente (Lima et al., 2001; Martins et al., 2008; Romero et al., 2012).

3.6.2.1. Substratos utilizados na fermentação submersa

3.6.2.1.1. Azeite de oliva

A oliveira (*Olea europea* L.) pertence à família Oleaceae. É uma das árvores frutíferas mais importantes em países mediterrânicos, onde cobrem 8 milhões de hectares, o que representa quase 98% da safra mundial. As árvores de oliva foram cultivadas pela primeira vez há mais de 5.000 anos na Síria, Líbano e Israel. No entanto foram os gregos os primeiros a exportar o óleo de oliva. Naquela época o óleo era utilizado como medicamento, ungüento ou bálsamo, perfume, combustível para iluminação e impermeabilizante de tecidos. Isso demonstra a importância

econômica e social da cultura e os possíveis benefícios a serem extraídos da utilização de qualquer um dos seus derivados (Oliveira, 2001; Pereira et al., 2007).

Atualmente, existem vários produtores de óleo de oliva (Azeite) (Figura 2 a) em todo mundo, dentre os quais se destacam: Argentina, Argélia, Espanha, Itália, Líbia, Marrocos, Portugal, Tunísia, Turquia, França e Grécia. É importante entender que o azeite de oliva é o único azeite que é extraído de uma fruta, os demais azeites são extraídos de um grão, uma semente ou noz (Pio et al., 2005). Esta planta foi tradicionalmente cultivada sob condições de chuva, mas devido a demanda para seus produtos fez necessária a implantação do método de irrigação em muitas áreas (Figura 2 b). No entanto tornou-se uma árvore muito tolerante à seca (Moriana et al., 2002). O cultivo de oliveiras adquiriu especial relevância, pelo fato do azeite de oliva ser benéfico à saúde humana, pela sua comprovada eficácia na proteção de enfermidades cardiovasculares e por ser muito utilizado nas indústrias de produtos farmacêuticos (Oliveira, 2001; Awan et al., 2003; Pio et al., 2005).

Olea europaea L. é amplamente estudada pelo seu uso alimentar, o fruto (Figura 2 c) possui um alto teor de gorduras monoinsaturadas, sendo esta fruta constituída de água (50%), óleo (22%), açúcar (19%), celulose (5,8%) e proteínas (1,6%). As folhas são importantes pelos seus metabolitos secundários. Os frutos e o óleo são componentes essenciais na dieta diária de uma grande parte da população do mundo (Pereira et al., 2007).

Alguns produtos do metabolismo secundário das folhas das oliveiras possuem propriedades hipotensiva e hipoglicêmica. Vários relatórios demonstraram que o extrato de folha de oliveira tem a capacidade de diminuir a pressão arterial em animais, e aumentar o fluxo sanguíneo nas artérias coronárias, aliviar a arritmia e prevenir espasmos musculares intestinais. Também podem ser utilizadas infusões de folhas, permitindo uma considerável ingestão e/ou absorção de compostos bioativos (Pereira et al., 2007).

Compostos voláteis da azeitona estão principalmente correlacionados às suas propriedades antioxidantes. Estes produtos possuem propriedades antimicrobianas de compostos fenólicos, particularmente hidroxitirosol e oleuropein (Moriana et al., 2002). Pereira e colaboradores (2007) realizaram um estudo sobre a atividade antimicrobiana in vitro de folhas de oliveira, analisando compostos fenólicos por HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e DAD (Detector Array Diode), avaliaram as atividades antimicrobianas dos extratos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de fungos.

De acordo com Pio et al. (2005), o Brasil é um dos maiores importadores de produtos de oliveira da América do Sul, sendo a Argentina um dos maiores fornecedores, além da Espanha e Portugal. Mesmo com um mercado consumidor de azeitonas e azeite de oliva constante, não se conseguiu, até os dias de hoje, que a olivicultura no Brasil se tornasse uma alternativa rentável e

viável para os produtores, devido principalmente a manejos inadequados e falta de conhecimento de modernas técnicas de formação e condução dos pomares. O óleo de oliva (também chamado de azeite de oliva) é extraído a partir do fruto devido ao óleo (15 a 35%) estar localizado nas células do mesocarpo das azeitonas, pelo método de pressão, centrifugação e sistemas de filtragem (Awan et al., 2003).

O azeite recém produzido tem uma aparência opaca, devido à presença de partículas sólidas da vegetação e a micro-gotas de água dos frutos. Estudos microbiológicos recentes tem mostrado que uma micro-flora rica está presente na fração de suspensão do óleo de oliva produzindo lipases, capaz de melhorar a qualidade do óleo, através da hidrólise dos triglicerídeos (Ciafardini et al., 2006).

As leveduras são responsáveis pelo processo de fermentação das azeitonas pretas, já a fermentação das azeitonas verdes é realizada pelo ácido láctico das bactérias. A fermentação das azeitonas pretas tem sido estudada em diferentes países, principalmente pela Espanha, Portugal, Grécia e Marrocos, mostrando grande biodiversidade das espécies de levedura, como espécies dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida* e *Torulaspora* (Coton et al., 2006).

Ciafardini e colaboradores 2006, realizaram testes com leveduras estocadas em coleção, previamente isolados de azeite. Dois isolados produtores de lipase extracelulares, *Saccharomyces cerevisiae* 1525 e *Williopsis californica* 1639 foram capazes de hidrolisar substratos sintéticos diferentes e específicos representados por p-nitrofenilo, o estearato de 4-nitrofenil palmitato, tripalmitina e trioleína, bem como azeite triglicéridos. A atividade da enzima em ambas as leveduras foi influenciada pela relação entre a solução aquosa e a fase orgânica. Além disso, os ácidos graxos livres do azeite provaram ser bons indutores de atividade lipásica, em ambas as leveduras. Trabalhos têm sido realizados utilizando-se azeite de oliva como fonte de carbono para produção de lipases, sendo este um óleo padrão para produção desta enzima (Ribeiro et al., 2011).



Figura. 2 Aspectos gerais da oliva (a) planta, (b) fruto e (c) óleo de oliva (Fonte: www.fisioterapiaquintana.blogspot.com)

3.6.2.1.2. Óleo de mamona

Mamoneira (*Ricinus communis* L), pertencente à família Euphorbiaceae, classificada no grupo das xerófilas, tendo hábito arbustivo, os racemos não se desenvolvem ao mesmo tempo na planta, o florescimento da mamoneira é chamado botanicamente de simpodial. Possui um lento crescimento no início do ciclo e uma elevada produção de frutos (Figura 3 a). A planta é de origem tropical, heliófita, resistente à seca e exigente em calor (20 a 30°C) e luminosidade. A mamoneira engloba um vasto número de tipos de plantas nativas da região tropical, com diversas colorações de caule, folhas e racemos (cachos). A colheita dos racemos, frutos e sementes da mamoneira é feita em várias etapas, periodicamente, com o intuito de minimizar os efeitos da desuniformidade de maturação e maximizar a qualidade das sementes (Figura 3 b). Considerada uma planta rústica, as variedades de mamona selecionadas para o cultivo apresentam, em geral, sementes com germinação lenta e desuniforme, ficando por mais tempo expostas aos patógenos de solo e às intempéries, o que resulta em estande final irregular. A mamoneira é considerada uma planta (Figura. 3 c) que exaure o solo, necessitando ser cultivada em solos muito férteis para que atinja boa produtividade. É uma planta com bastante representatividade no cenário econômico e social no Nordeste brasileiro (Silva et al., 2007; Fanan et al., 2009; Mendes et al., 2009; Bizinoto et al., 2010; Souza et al., 2010).

A mamona produz quantidade considerável de biomassa 20 t ha⁻¹, que podem ser devolvidas ao solo. As folhas da mamona podem servir de alimento para o bicho da seda; a haste, além da celulose para a fabricação do papel, pode fornecer matéria-prima para tecidos grosseiros. Suas sementes possuem um considerável teor de óleo (Fig. 3 d). A casca de mamona, um dos produtos gerados em grande quantidade no processo de descascamento e beneficiamento das sementes de mamona, apresenta quantidades significativas de alguns nutrientes. A torta é o principal subproduto da cadeia produtiva da mamona, produzida a partir da extração do óleo das sementes desta oleaginosa. Seu principal uso é como adubo, mas também pode ser utilizada como alimento animal devido ao seu alto valor protéico, no entanto seu uso ainda não é possível devido à carência de tecnologia viável para realizar sua destoxificação e desalergenização. Possui diversas propriedades como inseticida e nematicida fornece quantidades consideráveis de nitrogênio, fósforo e potássio. Atualmente, uma das principais aplicações da mamona diz respeito à obtenção do biodiesel, produto da reação do óleo de mamona com um álcool reagente, na presença de um agente catalisador. (Junior et al., 2008; Mendes et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Souza et al., 2010; Lima et al., 2011).

Em geral, os frutos possuem espinhos que, em alguns casos, são inermes; as sementes se apresentam com diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração. O óleo de

mamona, extraído pela prensagem das sementes, contém 90% de ácido graxo ricinoléico, o que lhe confere características singulares e versáteis, possibilitando uma ampla gama de utilização industrial com utilidade só comparável à do petróleo. Representando em média 48% do peso bruto da semente, e o mais denso e o mais viscoso de todos os óleos vegetais e animais, além de apresentar 5% a mais de oxigênio em relação aos demais óleos. Único óleo na natureza glicerídica, que é solúvel em álcool, pode se transformar em centenas de aplicações nas indústrias químicas e de cosméticos. Sendo usado na fabricação de; plásticos, fibras sintéticas, tintas, esmaltes, entre outros. Além de ser alternativa para produção de biodiesel o que tem despertado grande interesse, devido ao incentivo à produção de biodiesel. As características desse óleo e de seus coprodutos dão potencial para a obtenção de diversas substâncias fortemente valorizadas no mercado internacional, tais como ácidos e ésteres (Fanan et al., 2009; Bizinoto et al., 2010; EMBRAPA, 2015).

A mamona é uma oleaginosa de destacada importância no Brasil e no mundo, é aproveitada em mais de 500 itens pela indústria química. Cerca de 93% da produção do país estão no Nordeste. Da industrialização da mamona obtém-se, como produto principal, o óleo e, como subproduto, a torta, utilizada na restauração de terras esgotadas, com destaque na lavoura fumageira na Bahia (Ferreira et al., 2009; Mendes et al., 2009)

Atualmente, o Brasil é o 3º maior produtor de mamona, com produção de aproximadamente 120 mil toneladas na safra 2014, com produtividade média ainda baixa. O país atualmente importa óleo de mamona e derivados. Na safra 2014, 5,12 mil toneladas de óleo de mamona chegaram aos portos brasileiros. Para cada tonelada de semente de mamona processada, são gerados 530 kg de torta de mamona, estimando-se o resíduo em aproximadamente 66 mil toneladas de torta (Ferreira et al., 2009; Mendes et al., 2009; Embrapa, 2015)

Devido à extraordinária capacidade de adaptação às várias condições de clima, possui a capacidade de produzir satisfatoriamente bem sob condições de baixa precipitação pluvial, e solo passou a ser cultivada em diversas áreas do território nacional. 418 municípios da nordeste do Brasil apresentam condições de solo, precipitação pluvial e altitude favoráveis ao cultivo de mamoneira, com períodos de semeadura variável. Por ser fator fixador de mão-de-obra, gerador de emprego e de matéria-prima indispensáveis ao desenvolvimento do país, a mamona apresenta-se como alternativa de grande importância para o semi-árido brasileiro, onde a cultura da mamona obteve um aumento do plantio impulsionado pelo Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. Ocasionalmente na da mamona região semi-árida do Brasil. A meta de produção de biodiesel foi dimensionada com base na erradicação da miséria do nordeste brasileiro, ocupando dois milhões de famílias, que convivem com a fome (Mendes et al., 2009; Embrapa, 2015).

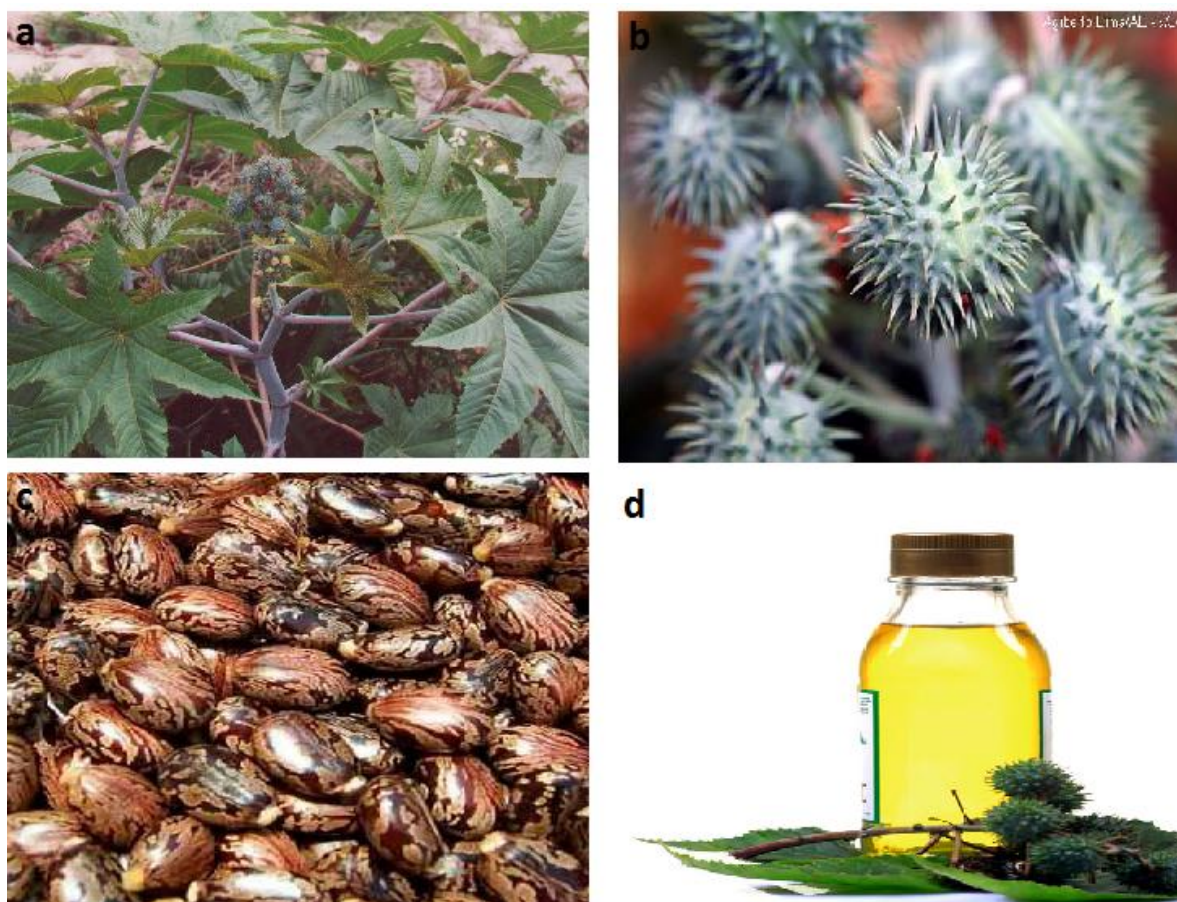


Figura. 3 Aspectos gerais da mamona (a) planta, (b) frutos, (c) sementes e (d) óleo (Fonte: www.agricultura.al.gov.br)

3.6.2.1.3. Óleo de licuri

O gênero *Syagrus*, pertence à família Arecaceae, subfamília Aerocoideae, tribo Cocoeae, subtribo Butineae, possui 30 espécies distribuídas na América do Sul, sendo que 16 espécies concentram-se na região Nordeste do Brasil e 14 são registradas na floresta Atlântica. Licuri, *Syagrus coronata* (Martius) Beccari, é uma espécie predominante nas regiões secas e áridas, ocupa toda a porção oriental e central da Bahia, até o sul de Pernambuco, abrangendo ainda os estados de Sergipe e Alagoas. Cresce tanto em solos férteis e profundos como em solos pedregosos, até em áreas com afloramentos rochosos, mas não se adapta aos solos encharcados ou permanentemente úmidos (Crepaldi et al., 2001; EMPRAPA, 2015).

O licurizeiro é uma palmeira monóica (Fig. 4 a), cujo porte pode variar de pequeno a grande, pode ser solitária ou cespitosa, seu tronco e muito curto, subterrâneo a ereto e alto cuja altura varia de 6-10 metros com média de 25cm de diâmetro. Suas folhas são pinadas, distribuídas

helicoidalmente em cinco fileiras, inflorescências interfoliares. Presença de projeções fibrosas semelhantes a espinhos nas margens do pecíolo foliar. Floresce e frutifica durante todo o ano. Sua frutificação (Fig. 4 b) inicia-se seis anos após o plantio. A produção média anual em um licurizal nativo é de 2.000 Kg/ha de frutos (Rodrigues et al., 2011).

A propagação do licuri é feita exclusivamente de forma sexuada. Como a maioria das espécies da família Arecaceae, a germinação da semente do licuri, ocorre vários dias após o plantio, mesmo sob condições adequadas de umidade, temperatura e luminosidade (EMPRAPA, 2015).

A espécie possui estratégias autodefensivas (resistência) às adversidades do Semi-árido, produzindo na superfície dos seus folíolos uma crosta de cera que, pela transparência, permite a passagem de raios solares, para a assimilação clorofiliana, que evita a perda de água pela planta. Parte dessa resistência deve-se ao fato das plantas, ao perder as folhas velhas, manterem vivos, por cerca de 3 a 4 anos (EMPRAPA, 2015).

Fibras de licuri, obtidas a partir da folha de palmeira, são fontes de matéria-prima sendo utilizadas para fabricação de tecido, produção de objetos utilitários e de artesanato, tais como vassouras, chapéus, cestas, esteiras, espanadores, forragem para os animais, sendo trituradas e utilizadas como ração, cobertura de construções campestres, paredes e portas. As folhas velhas, devido ao seu teor gorduroso, são usadas para confecção de fachos para iluminação noturna ou utilizadas como fonte de energia em fornos domésticos. São também usadas como mistura de fibras naturais e sintéticas (Crepaldi et al., 2001).

A polpa e as amêndoas (Fig. 4 c) são consumidas in natura, sendo usadas para fabricação de cocadas. Delas extrai-se um óleo usado na culinária (Bondar, 1938). A amêndoa seca fornece 38% de um óleo incolor, transparente, de densidade de 0,921 a 15°C. As amêndoas são utilizadas, também, como substitutas do milho para a alimentação de aves. A determinação da composição nutricional indicou que o fruto é altamente calórico. Os principais constituintes das amêndoas são lipídeos e proteínas. Na polpa, o α -caroteno é um importante constituinte. A presença de carotenóides, compostos com atividade pró-vitâmica A. Portanto, seu consumo é importante nas regiões pobres de países em desenvolvimento, onde a hipovitaminose A é endêmica, afetando, principalmente, o desenvolvimento das crianças na idade pré-escolar (Crepaldi et al., 2001).

Óleo de licuri (Fig. 4 d) é extraído dos frutos da licurizeiro, pode ser uma fonte nutricional alternativa para animais no Nordeste brasileiro. É importante fonte de alimento para pessoas e animais. Sua amêndoa é usada como substituta do milho para a alimentação das aves. A composição nutricional indicou que o fruto é altamente calórico. Os principais constituintes das amêndoas são lipídeos e proteínas. Na polpa, o β -caroteno é um importante constituinte. A

utilização do óleo como parte da alimentação não é bem descrito, e a sua utilização é restrita a fabricação de cosméticos (Crepaldi et al., 2001; Silva et al., 2011).

No sertão baiano o licuri é conhecido como a árvore salvadora da vida, é a principal fonte de alimento nos períodos drásticos de seca, sendo ainda desconhecida quanto aos seus constituintes dietéticos básicos.

Palmeira da região semi-árida do nordeste do Brasil é bem adaptada às regiões de savana. Ele tem um grande potencial em termos de alimentação de ornamentação e alimento para animais. Podendo contribuir para a renda e melhoria de vida da população destas áreas. No entanto, esta cultura ainda é explorada em extração (Borja et al., 2010; Leão et al., 2011).

Lima e colaboradores 2011, utilizou o óleo de licuri como suplemento na alimentação de gado leiteiro, obtendo alteração na composição do leite através de um aumento da percentagem de gordura e sólidos totais.

Belviso et al., 2013 testaram a capacidade antioxidante do licuri, constataram um aumento de compostos fenólicos totais, flavonóides totais e taninos condensados após o processo de torrefação. A capacidade antioxidante de sementes torrado foi maior do que a de amostras em bruto.

Barbosa et al. 2012, verificaram que adição de óleo de licuri em até 4,5% na dieta de caprinos pré-púberes não alterou o desenvolvimento testicular com base nas características da biometria e morfometria testicular, indicando que a inclusão de até 4,5% de óleo de licuri na dieta pode ser utilizada.

Rodrigues et al. 2011, realizaram um pré-tratamento de rato peritoneal macrófagos com 33 µg/m de extrato aquoso de licuri reduziu o índice de associação entre macrófagos e *Leishmania amazonensis* por 70,4%, com um aumento concomitante de 158,3% em óxido nítrico produzidos pelos macrófagos infectados. Além disso, o extrato aquoso não exibiu efeito citotóxico em células de mamíferos e não provocou reacções alérgicas in vivo, indicando boas perspectivas para o desenvolvimento de novos fármacos a partir do licuri para tratar a leishmaniose.

Além das propriedades conhecidas o licuri apresenta um grande potencial a ser explorado. Possui alta quantidade de lipídios, seu óleo quando aplicado integralmente passa adiante as características para os produtos feitos a partir dele (Leão et al., 2011).

É um óleo promissor, podendo ser testado na produção de enzimas como a lipase. Não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando o óleo de licuri como substrato para a produção de lipases.



Figura. 4 Aspectos gerais do licuri: (a) planta, (b) fruto, (c) amêndoa e (d) óleo (fonte: www.coopes.org.br)

3.7. CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES

Koblitz & Pastore, (2006) caracterizaram a lipase produzida por isolados de *Rhizopus* sp. encontrando atividade ótima a 50°C e dois valores de pH ótimos 5.5 e 7.0, sendo esta enzima estável em pH variando de 6.5 a 7.5 e a temperaturas abaixo de 50°C. A enzima foi inativa na presença de Hg^{+2} e n-bromosuccinimide e ativada na presença de Na^{+} .

Estudos de produção de lipase por *Fusarium oxysporum* mostraram que o pH ótimo para a atividade da enzima foi 7.0, sendo 55°C a temperatura para a melhor atividade. Esta lipase apresentou uma boa estabilidade em temperatura de até 90% e a pH variando entre os valores de 6.5 a 8.0. (Saad et al., 2005)

3.8. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES

A otimização das condições de fermentação para a produção de lipases microbianas é de suma importância, uma vez que os parâmetros de cultivo influenciam as propriedades do micro-organismo produtor, assim como a razão de lipases extracelulares e intracelulares produzidas (Ribeiro et al., 2011). A quantidade de lipases produzidas depende de diversos fatores, tais como fontes de carbono e nitrogênio, presença de lipídeos, de indutores ou inibidores, concentrações de sais inorgânicos, disponibilidade de oxigênio, temperatura, pH e inóculo.

Os métodos tradicionais de otimização são caros por requererem um grande número de variáveis, além de consumirem muito tempo para a sua conclusão. A otimização através do Planejamento Plackett-Burman (PB) e superfície de resposta, podem limitar as variáveis e com isso reduzir o tempo do experimento.

Planejamento Plackett-Burman (PB) é um método valioso para a seleção dos componentes significativos do meio de cultivo que influenciam a produção de lipases a partir de um grande número de variáveis componentes, obtendo-se um conjunto menor de variáveis. Um número total de experiências deve ser efetuada de acordo com planejamento Plackett-Burman, por exemplo $n + 1$, em que n é o número de variáveis. Cada variável é representado em dois níveis, alto e baixo denotado por (+) e (-), respectivamente. Cada coluna deve conter igual número de sinais positivos e negativos (Kong et al., 2012).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma ferramenta complementar que pode ser utilizada para potencializar a otimização após o uso de outros planejamentos estatísticos, para conhecermos o nível ótimo das variáveis selecionadas e estudarmos as suas interações. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é um processo que envolve três passos importantes: realizar as experiências concebidas estatisticamente, estimando o coeficientes em um modelo matemático prevendo a resposta e verificando a adequação do modelo (Kong et al., 2012).

3.9. PURIFICAÇÃO DE LIPASES

Os trabalhos publicados relacionados à purificação de lipases, em geral, visam obtê-las na forma pura, para então, poder realizar os estudos de caracterizações físico-químicas, químicas e biológicas. Entretanto, os detalhes da metodologia otimizada empregada nos processos de purificação de lipases em nível industrial e comercial são reservados e conduzidos sob segredo (Oliveira, 2000; Sharma et al., 2001). As estratégias de purificação de lipases com propósitos

industriais devem ser rápidas, aplicáveis em operações de larga escala e ser relativamente de baixo custo (Gupta et al., 2004; Juntachai et al., 2011).

Uma vez purificadas, as enzimas devem manter a sua especificidade catalisadora durante o armazenamento e comercialização, até a sua utilização. Para isso, lança-se mão da utilização de substâncias aditivas além da enzima, tais como, soluções de força iônica de sais neutros (sulfato de amônio e fosfato de potássio); polióis (glicerol, manitol e sorbitol); antibióticos; agentes quelantes; inibidores de enzimas contaminantes; e ainda submetê-la ao processo de liofilização. Geralmente, para serem liofilizadas, são acrescidos estabilizadores (predominantemente a soro albumina bovina, uma proteína inerte) à enzima, podendo ser armazenada por longos períodos. A adição de sais e de polióis e a liofilização, adicionalmente, inibem o crescimento microbiano por reduzirem a disponibilidade de água (Bon et al., 2008).

Para a purificação de lipases, os procedimentos cromatográficos são mais comumente usados, por serem mais eficientes, no entanto seus custos são elevados. Como as lipases são reconhecidamente de natureza hidrofóbica suas purificações têm sido estudadas em torno da cromatografia de afinidade, como a cromatografia de interação hidrofóbica que tem crescido enormemente nos últimos anos (Gupta et al., 2004).

Inúmeras estratégias de purificação de lipases têm sido descritas variando os protocolos de purificação de acordo com o tipo de lipase. Na maioria das vezes, apenas uma etapa cromatográfica no processo de purificação não é suficiente para alcançar o nível de pureza desejado, tornando-se necessária a combinação de mais de uma etapa cromatográfica (Saxena et al., 2003; Mhetras et al., 2009; Messias et al., 2011).

Koblitz & Pastore (2006) após purificação da fração lipolítica produzida por *Rhizopus* sp., obtiveram sucesso atingindo a homogeneidade após três etapas de purificação SDS-PAGE.

Os sistemas de duas fases aquosas são utilizadas em bioseparação composta de dois polímeros incompatíveis (por exemplo, dextrano x PEG (polietilenoglicol)), em solução em água ou uma concentração elevada de sal (por exemplo, fosfato). A partição de proteínas em solução do sistema de duas fases aquosa depende das propriedades físico-químicas, por exemplo hidrofobicidade da proteína, carga e tamanho. O compartimentação é influenciada alterando os polímeros, polímeros massa molecular, ou o pH, ou pela adição de sais ou detergente para o sistema (Gupta et al., 2004; Messias et al., 2011).

Quando comparada com outros processos de separação é uma técnica simples, interessante com propriedades adequadas para a purificação de macromoléculas que são difíceis de purificar. Duas lipases, uma ácida e uma neutra de *Bacillus stearothermophilus* SB1 foram purificadas

utilizando PEG e sal, com as lipases preferencialmente particionamento para a fase de PEG, devido à interações hidrofóbicas com grupos etileno do polímero (Gupta et al., 2004).

3.10. APLICAÇÃO DA LIPASE EM EFLUENTES DE ABATEDOURO DE BOVINO

Nas atividades agroindustriais, a geração de resíduos mostra-se bastante expressiva, entre as quais se destacam os matadouros. O rebanho bovino brasileiro é um dos maiores do mundo 160 milhões a cerca de 205 milhões de cabeças (www.diadecampo.com.br, 2015). O abate de bovinos e suínos, assim como de outras espécies animais, é realizado para obtenção de carne e de seus derivados, destinados ao consumo humano. As maiores regiões produtoras estão no Centro-Oeste (34,24%), seguidas pelo Sudeste (21,11%), Sul (15,27%), Nordeste (15,24%) e Norte, com 14,15% do rebanho nacional (ANUALPEC, 2015 apud SIC, 2015).

Em Pernambuco, essas atividades contribuem de maneira significativa para a crescente poluição dos corpos receptores, uma vez que tecnologias de tratamento de seus despejos, mesmo existentes, são pouco empregadas. As inspeções realizadas pela Adagro (Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco) verificaram que apenas 4 dos 156 matadouros obedecem aos critérios de localização, origem e tratamento da água, condições higiênicas, abate humanitário do animal, equipamentos, qualificação de pessoal, transporte da mercadoria e tratamento de resíduos (Paulista, Paudalho, São Lourenço e Parnamirim) (Adagro, 2015).

A água é essencial para as atividades da indústria da carne. Depois do uso, torna-se um transportador de matéria orgânica que é produzido em o processo. Se não tratada, irá poluir em larga escala a terra e a água (Rigo *et al*, 2008; Thebaldi et al, 2011). Em abatedouros, assim como em vários tipos de indústria, o alto consumo de água acarreta grandes volumes de efluentes - 80 a 95% da água consumida é descarregada como efluente líquido (www.diadecampo.com.br, 2015).

Estes efluentes de abatedouro apresentam grande poder poluente, principalmente por alta carga orgânica, devido à presença de sangue, gordura, esterco, conteúdo estomacal não-digerido e conteúdo intestinal, Alto conteúdo de gordura, flutuações de pH em função do uso de agentes de limpeza ácidos e básicos, altos conteúdos de nitrogênio, fósforo e sal, flutuações de temperatura (uso de água quente e fria). Desta forma, os despejos de abatedouros possuem altos valores de DBO5 (demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (demanda química de oxigênio) parâmetros utilizados para quantificar carga poluidora orgânica nos efluentes, além de sólidos em suspensão, graxas e material flotável (Pacheco 2006; Oliveira *et al*, 2011).

Fragmentos de carne, de gorduras e de vísceras normalmente podem ser encontrados nos efluentes. Portanto, juntamente com sangue, há material altamente putrescível nestes efluentes, que

entram em decomposição poucas horas depois de sua geração, quanto mais alta for a temperatura ambiente. O sangue tem a DQO mais alta de todos os efluentes líquidos gerados no processamento de carnes. Sangue líquido bruto tem uma DQO em torno de 400g/l e DBO5 de aproximadamente 200g/l. Caso o sangue de um único bovino fosse descartado diretamente na rede, o acréscimo de DQO no efluente seria equivalente ao do esgoto total produzido por cerca de 50 pessoas em um dia (Pacheco, 2006).

As lipases são particularmente importantes devido ao fato da especificidade em hidrolisar óleos e graxas, que é de grande interesse para diferentes aplicações industriais, entre eles o tratamento de efluentes de abatedouros (Rigo et al, 2008; Oliveira et al, 2011). A adição da enzima lipase pode aumentar significativamente a eficiência do tratamento dos efluentes, pois permite uma redução dos níveis de sólidos suspensos, lipídeos e proteínas o que reduz os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos (Mendes et al (2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizadas 53 culturas de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral no período de 1955 a 2011 na Coleção de Culturas Micoteca URM (WDCM604) mantido em tubos de ensaios contendo o meio de cultivo ágar Sabouraud, acrescido 5% de extrato de levedura a 28 °C.

4.2. REATIVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA DAS CULTURAS

A reativação foi realizada através da retirada de fragmentos das culturas preservadas sob óleo mineral, transferidos com auxílio de uma alça de platina para caldo glicosado e mantidos a 28°C ± 2°C. Após crescimento, as culturas foram transferidas para o meio agar Sabouraud acrescido de extrato de levedura (YES) e mantidos a 28°C ± 2°C durante dias. Para realização da autenticação taxonômica, foram observadas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas segundo Domsch e Gams (1993), Barnett et al. (2000) e de Hoog et al. (2000).

4.3. DETECÇÃO LIPOLÍTICA

Para determinação da capacidade lipolítica, foram retirados fragmentos das culturas mantidas em SYE contidos em tubo de ensaio e transferidos para o centro da placa de Petri contendo o referido meio. Após sete dias de crescimento, fragmentos da cultura foram transferidos para tubos contendo o meio agar-água, sendo posteriormente pipetado para o centro da placa de Petri com meio de cultura, contendo 10g peptona, 5g cloreto de sódio, 2g cloreto de cálcio, 20g ágar e 10 ml Tween 20, ajustado o pH para 7,4. Proposto por Sierra (1957) em triplicata. As culturas foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) (TECNAL TE424) a 28°C e 37°C $\pm$ 2°C, observadas durante 24, 48, 72 e 96 horas, evidenciando-se um halo claro em torno das colônias indicativo de atividade lipolítica. O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela média aritmética da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia segundo Hankin et al. (1971) e Hankin e Anagnostakis (1975).

4.4. FERMENTAÇÃO SUBMERSA

O experimento foi realizado em duplicata utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo meio I composto por 1% (v/v) de óleo de oliva adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, pH 6,5, meio II contendo 1% (v/v) de óleo de mamona adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, pH 6,5 e meio III composto por 1% (v/v) de óleo de licuri adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, pH 6,5. Esterilizados a 120°C durante 15 minutos, resfriados e inoculados com um disco de 5 mm obtidos a partir da colônia central e incubados em agitador orbital (TECNAL TE424) a 160 rpm a 37°C por 96 horas.

4.5. ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase de acordo com Pimentel et al. (1994), com base na hidrólise de p-nitrofenilpalmitato (pNPP) em p-nitrofenol (PNP) e palmitato. A atividade consiste na mistura de 1 ml de extrato bruto enzimático e 9 ml da solução substrato (0,018 g p-nitrofenilpalmitato (pNPP) dissolvido em 6 ml de isopropanol, em 450 ml de tampão fosfato 50 mM pH 8,0 contendo 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica). A liberação de pNP a 37 °C, em 30 minutos de incubação, foi detectada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a clivagem de 1 μ mol/min pNPP, pH 8,0 (0,05 M de fosfato

tampão fosfato), 37 °C. O coeficiente de absorção molar de pNPP ($1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática.

4.6. OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE PRODUÇÃO DE LIPASES POR ESTATÍSTICA DE APROXIMAÇÃO

4.6.1. Meio de fermentação

O meio de produção de lipases foi preparado utilizando óleo de licuri (1% do total de sólidos suspensos) como meio basal, que continha diferentes concentrações de nutrientes testados de acordo com os experimentos do planejamento estatístico. O meio de cultivo teve o pH inicial ajustado de acordo com o planejamento e esterilizado a 121 °C durante 15 min. Discos do inóculo preparado foram adicionados a cada 50 mL de meio em Erlenmeyer de 250 mL de acordo com a concepção da matriz. Os frascos foram incubados por até cinco dias sob diferentes temperaturas, sob agitação orbital em diferentes rotações.

4.6.2. Identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipases usando planejamento Plackett-Burman (PB)

Com base no design PB, cada componente foi examinado em dois níveis: "-1" para baixo e nível '+1' para cima. Foram testados 11 variáveis, utilizando o pacote de software estatístico, que gerou um conjunto de 12 ensaios experimentais e possibilitou a identificação estatística das variáveis mais significativas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A Tabela 1 mostra os componentes do meio sob análise, bem como os níveis de cada uma das variáveis usadas no planejamento, enquanto a tabela 2 representa a matriz.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento Plackett-Burman (PB)

Variáveis	Inferior (-1)	Superior (+1)
1 - Tempo de incubação H	72	120
2 – pH	5	7
3 – Temperatura C	28	36
4 – Rotação RPM	100	150
5 - Tamanho do inóculo mm	5	7
6 – óleo %	0,5	1
7 - Extrato de levedura %	0	0,5
8 - Cloreto de sódio %	0,5	1
9 - Cloreto de cálcio %	0	0,1
10 -Sulfato de amônio %	0	0,1
11 - KH ₂ PO ₄ %	0	0,1

Tabela 2. Total de ensaios e variáveis correspondente a cada ensaio

Ensaios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	120	7	28	150	5	0,5	0	1	0,1	0,1	0
2	120	7	28	150	7	0,5	0,5	0,5	0	0	0,1
3	72	7	40	100	7	0,5	0	0,5	0,1	0,1	0,1
4	72	5	40	150	7	0,5	0,5	1	0	0,1	0
5	120	7	40	100	7	1	0	1	0	0	0
6	72	5	28	100	5	0,5	0	0,5	0	0	0
7	120	5	40	100	5	0,5	0,5	1	0,1	0	0,1
8	72	5	28	150	7	1	0	1	0,1	0	0,1
9	120	5	40	150	5	1	0	0,5	0	0,1	0,1
10	72	7	40	150	5	1	0,5	0,5	0,1	0	0
11	72	7	28	100	5	1	0,5	1	0	0,1	0,1
12	120	5	28	100	7	1	0,5	0,5	0,1	0,1	0

4.6.3. Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicada para otimizar as variáveis selecionados através do planejamento PB. Desta forma, as concentrações dos três fatores significativos, nomeadamente: temperatura, concentração de óleo de licuri e concentrações de KH_2PO_4 (Tabela 3), foram escolhidos um conjunto de 20 ensaios experimentais, com seis pontos centrais replicados, foram usados para MSR. As variáveis independentes foram estudadas em três diferentes níveis: baixos (-1), médio (0) e alto (1). Experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio (pH 7,0) preparado de acordo com o design. A incubação foi realizada a 100 rpm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 3. Variáveis significativas utilizadas na metodologia de superfície de resposta (MSR)

Variáveis independentes	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	28	31	34	37	40
Óleo (%)	0,5	0,625	0,75	0,875	1
KH_2PO_4 (%)	0	0,025	0,05	0,075	1

4.7. PURIFICAÇÃO DA LIPASE EM SISTEMA DE DUAS FASES

4.7.1. Enzima

O extrato enzimático bruto utilizado foi mantido acondicionado em refrigerador a temperatura de 4 °C, sendo utilizado no momento do processo de purificação.

4.7.2. Preparação das fases aquosas

O sistema de duas fases aquosas foi composto de PEG (6.000, 8.000 e 10.000), fostado de sódio (pH 6.0) fosfato de potássio (pH 7.0 e 8.0). Foram preparadas para estudar o efeito da massa molar do PEG e do fosfato de sódio e de potássio na partição da lipase, nas concentrações mostradas na tabela 4, de acordo com metodologia descrita por Marini et al, (2011). Estudos de partição foram feitos em tubos graduados de 10 mL e o peso total do sistema foi de 10 g, após o acréscimo da água. Os tubos graduados contendo o sistema foram homogeneizados no vórtex durante 1 min, após esse procedimento os tubos permaneceram em repouso por 60 min, para completar separação de fases. Após a separação das fases, o volume de cada fase foi mensurado e utilizado para estimar a razão entre as fases superior (Top) e inferior (Botton). Depois, amostras das fases foram coletadas em eppendorfs e em seguida, avaliada a atividade de lipases, em triplicata.

Tabela 4 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^4) para a purificação de lipases por sistema de duas fases aquosas

<i>ensaio</i>	<i>MPEG</i>	<i>CPEG</i>	<i>Fosfato</i>	<i>pH</i>
1	6000	20	15,0	6
2	10000	20	15,0	6
3	6000	24	15,0	6
4	10000	24	15,0	6
5	6000	20	20,0	6
6	10000	20	20,0	6
7	6000	24	20,0	6
8	10000	24	20,0	6
9	6000	20	15,0	8
10	10000	20	15,0	8
11	6000	24	15,0	8
12	10000	24	15,0	8
13	6000	20	20,0	8
14	10000	20	20,0	8
15	6000	24	20,0	8
16	10000	24	20,0	8
17c	8000	22	12,5	7
18c	8000	22	12,5	7
19c	8000	22	12,5	7
20c	8000	22	12,5	7

4.7.3. Determinação do Teor de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), empregando padrões de albumina de soro bovino (BSA).

4.7.4. Determinação do coeficiente de partição (K)

O coeficiente de partição (K) foi calculado por meio da relação entre as atividades enzimáticas da fase superior com a fase inferior.

4.7.5. Determinação do rendimento da enzima (R_{EC})

O rendimento da extração (% R) foi obtido por meio da relação entre a atividade total da enzima [U] na fase considerada multiplicado pelo volume da fase pela atividade total da enzima [U] no extrato enzimático bruto multiplicado pelo volume acrescentado, multiplicados por cem.

4.7.6. Determinação do aumento da pureza da lipase (AP)

O aumento da pureza da lipase, AP foi obtido mediante relação entre as atividades específicas do extrato purificado e a concentração de proteína pelas atividades específicas da enzima e a concentração de proteína.

4.8. CARACTERIZAÇÃO DAS LIPASES PRODUZIDAS POR *TRICHOSPORON SPOROTRICHOIDES* URM 6630

Para caracterização enzimática parcial utilizou-se os isolados fermentados em meio de licuri, pois apresentaram maior produção enzimática nas condições de cultivo, e foi avaliado o efeito do pH, temperatura, íons e outros parâmetros sobre a atividade enzimática.

4.8.1. Efeito e estabilidade ao pH e a temperatura

Para estudar o efeito e a estabilidade ao pH ótimo para a atividade da lipase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 3,0 - 10,0 usando os seguintes tampões (100 mM): citrato (pH 3,0 – 6,0), fosfato (pH 6,0 – 8,0), Tris-HCL (pH 8,0) e carbonato (pH 9,0 – 10,0). Atividade residual foi então analisada. (Dantas; Aquino, 2010). Para estudar o efeito e a estabilidade à temperatura a atividade da lipase, o extrato bruto enzimático foi testado em diferentes temperaturas entre 30 e 90° C. A atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Dantas; Aquino, 2010).

4.8.3. Efeito a íons, detergentes e solventes orgânicos

Para avaliação dos efeitos de íons, detergente e de solventes orgânicos, o extrato bruto foi incubado com os inibidores (1:1) a 37 ° C por 30 min. Após esse período acrescentou-se a solução substrato e foi realizada a leitura em espectrofotometro. A atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%) (Dantas; Aquino, 2010).

4.9. APLICAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 EM EFLUENTES DE ABATEDOURO DE BOVINOS

4.9.1. Caracterização físico-química do efluente e aplicação do extrato enzimático bruto

Amostras de efluente de abatedouro de bovino, utilizado em todos os experimentos foram coletados na cidade de Paulista no Estado de Pernambuco (Brasil). As amostras foram coletadas do ponto de descarte do abatedouro, sem qualquer tratamento prévio durante o funcionamento normal do abatedouro. A temperatura e pH do efluente foram monitorados no momento da coleta 35 °C e 5, respectivamente. As amostras foram transferidas para um recipiente refrigerado (4 °C) durante a coleta. O conteúdo do recipiente foi homogeneizado e armazenado a 4 ° C, uma amostra do efluente foi caracterizada em termos de demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos totais (ST) e óleos e gorduras (O e G), de acordo com os procedimentos descritos na tabela 5.

Tabela 5. Análise físico-química do efluente

Parâmetros	Método	Unidade
Demanda Química de Oxigênio	SMEWW 5220 C	mg O ₂ /L
Sólidos Totais	SMEWW 2540 B	mg/L
Óleos e Graxas Totais	SMEWW 5520 D	mg/L
Óleos e Graxas Minerais	SMEWW 5520 F	mg/L
Óleos e Graxas Vegetais e Gordura Animal	SMEWW 5520 F	mg/L
Sólidos Suspensos Voláteis	SMEWW 2540 D	mg/L

4.9.2. Ensaaios enzimáticos sobre o efluente

Neste trabalho utilizou-se o extrato enzimático bruto, que foi mantido a -10 ° C e utilizado sem qualquer purificação. Uma amostra do efluente de abatedouro de bovinos com 10 g/L, foi transferida para um Erlenmeyer de 100 mL. A normalização do teor de óleo e graxa foi realizada misturando do teor de óleo e graxa conhecida. Cada reação foi realizada durante 16 horas. Como controle, uma corrida experimental foi realizada sem a adição da enzima. As amostras do meio de reação foram recolhidas para posterior análise da atividade enzimática por espectrofotometria.

A avaliação do efeito dos fatores sobre a hidrólise de óleos e graxas dos efluentes foi realizada por um planejamento experimental que permitiu a obtenção de resultados com um número reduzido de 20 ensaios. As variáveis estudadas foram: quantidade de enzima 2% (m/v), 5%(m/v), 8% (m/v), temperatura 26 °C, 33 °C e 40 °C e pH 6.0, 7.0 e 8.0 (Rigo et al, 2008 modificado). A matriz do planejamento fatorial encontra-se apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo (2^3) para a aplicação de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630

<i>Ensaio</i>	<i>T (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>E (% m/v)</i>
1	25(-1)	6.0 (-1)	2 (-1)
2	25(-1)	6.0 (-1)	8 (+1)
3	25(-1)	8.0 (+1)	8 (+1)
4	25(-1))	8.0 (+1)	2 (-1)
5	40(+1)	6.0 (-1)	8 (+1)
6	40(+1)	6.0 (-1)	2 (-1)
7	40(+1)	8.0 (+1)	2 (-1)
8	40(+1)	8.0 (+1)	8 (+1)
9a	33 (0)	7.0 (0)	5 (0)
9b	33 (0)	7.0 (0)	5 (0)
9c	33 (0)	7.0 (0)	5 (0)
9d	33 (0)	7.0 (0)	5 (0)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VIABILIDADE E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA DAS CULTURAS DE *Trichosporon*

Das 53 culturas de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral, 50 permaneceram viáveis, mantendo as características típicas da espécie. Apenas três culturas estavam inviáveis, sendo: URM 573, URM 3963 e URM 4914, todas pertencentes à espécie *T. cutaneum* (Tabela 4). Desta forma o método de preservação sob óleo mineral, apresentou-se adequado para a manutenção de culturas de *Trichosporon* uma vez que tais micro-organismos se mantiveram viáveis após estocagem durante 55 anos. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os obtidos por Braz et al., (2009). Estes autores avaliaram a viabilidade de 31 isolados de *Acremonium* preservados sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM, Brasil. Do total, 26 mantiveram-se viáveis, preservando suas características morfofisiológicas. Avaliando culturas pertencentes aos gêneros *Cladosporium* e *Trichosporon* preservadas também sob óleo mineral, Silva, (2009) observaram viabilidade de até 40 anos. De acordo com Figueiredo (2001), uma ampla variedade de fungos sobrevive nesse método, mantendo estabilidade entre 6, 7 e até mesmo 20 anos. Os resultados obtidos no presente estudo superam os já relatados pela literatura, visto que culturas de *Trichosporon* spp. com 55 anos de preservação mantiveram-se viáveis. Entretanto, para alguns gêneros de fungos este método de preservação pode não ser eficaz. Por exemplo, Bezerra et al. (2006) avaliaram 20 culturas de *Coccidioides immitis* preservadas Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz e apenas cinco delas foram viáveis.

A determinação da viabilidade fornece dados importantes da sobrevivência das células durante o procedimento de preservação e tempo de manutenção destas culturas em coleções, bem como a importância da utilização de pelo menos dois métodos de preservação das culturas em duplicata, garantindo que isolados quando sensíveis a determinado método de preservação possam ser reativados, para estudos, a partir de outro método. É importante enfatizar que a Micoteca URM mantém culturas de *Trichosporon* e os demais fungos filamentosos e leveduras em pelo menos dois métodos de preservação em duplicata.

Tabela 7. Viabilidade, avaliação qualitativa e quantitativa da produção de lipase, através de fermentação submersa, por espécies de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM.

Nº URM	Espécie	Viabilidade	Avaliação Qualitativa	Atividade de lipase (U/mL)		
				Óleo de Oliva	Óleo de Mamona	Óleo de Licuri
572	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,85	18,80	21,69
573	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
695	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	10,69	25,87	23,92
1002	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	14,67	16,01	27,92
1015	<i>Trichosporon appendicularis</i> Batista & Silveira	+	+	13,63	28,11	23,68
1018	<i>Trichosporon sericeum</i> (Stautz) Diddens & Lodder	+	+	11,39	19,85	16,06
1028	<i>Trichosporon figueirae</i> Batista & Silveira	+	+	10,69	16,01	16,36
1034	<i>Trichosporon capitatum</i> Diddens & Lodder	+	+	10,69	17,26	36,02
1080	<i>Trichosporon beigelli</i> Kucker ex Raben	+	+	8,80	24,13	17,21
1099	<i>Trichosporon capitatum</i> Diddens & Lodder	+	+	12,78	20,54	21,04
1100	<i>Trichosporon fermentans</i> Diddens & Lodder	+	+	14,67	17,26	20,99
1103	<i>Trichosporon sericeum</i> (Stautz) Diddens & Lodder	+	+	25,22	24,12	15,77
1282	<i>Trichosporon lodderi</i> Phaff., Mrak & Williams	+	+	12,58	19,50	22,43
1291	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	15,52	21,04	34,42
1323	<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	+	+	10,69	22,43	30,59
1404	<i>Trichosporon infestans</i> Moses & Viana	+	+	13,78	17,41	34,72
1723	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	17,41	16,01	15,47
2235	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,85	24,67	26,81
2330	<i>Trichosporon arenicolo</i> Marques & Aciloe de Queiroz	+	+	17,76	20,69	27,86
2606	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	23,63	17,26	15,32
2872	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	11,04	17,26	19,45
3255	<i>Trichosporon fennicum</i> Sunk & Yarrow	+	+	9,15	21,39	38,35
3963	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
4250	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	12,23	24,47	14,57

4251	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	9,85	21,39	23,93
4259	<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	+	+	11,39	25,02	38,55
4437	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	7,76	25,87	33,03
4440	<i>Trichosporon aquatile</i> Hedrick & Dupont	+	+	12,93	22,93	32,98
4486	<i>Trichosporon lutetiae</i> Saëz	+	+	16,51	18,25	19,70
4488	<i>Trichosporon dulcitum</i> (Berkhout) Weijiman	+	+	11,04	24,32	16,51
4789	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	12,93	21,39	15,42
4846	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	8,95	21,54	35,02
4914	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
4973	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,45	13,08	38,16
5003	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,50	17,61	22,33
5196	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,30	18,11	25,22
5287	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	15,02	15,17	26,76
5743	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,30	21,54	21,19
5781	<i>Trichosporon ashaii</i> Akagi ex Sugita, A. Nishikawa & Shinoda	+	+	11,39	17,61	20,84
6076	<i>Trichosporon asteroides</i> (Rischin) M. Ota	+	+	19,50	19,85	18,11
6077	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	10,84	13,08	22,38
6078	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	16,36	14,32	22,24
6079	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	10,84	22,43	19,30
6080	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	11,54	22,43	18,35
6248	<i>Trichosporon sporotrichoides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog	+	+	12,23	23,97	25,92
6290	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	22,93	24,12	29,89
6291	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	11,04	20,34	18,25
6292	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	9,15	22,23	24,97
6293	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	19,30	18,10	18,26
6294	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	11,74	17,61	32,78
6295	<i>Trichosporon cutaneum</i> (Beurm., Gougerot & Vaucher bis) M. Ota	+	+	6,56	13,63	23,33
6296	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	10,34	17,76	16,96

6630	<i>Trichosporon sporotrichoides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog	+	+	32,63	34,03	39,85
------	---	---	---	-------	-------	-------

(-) : não viável; (+) : crescimento; (NR): não realizado

5.2. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR CULTURAS DE *Trichosporon*

Quanto à avaliação qualitativa da produção de lipases, todas as 50 culturas viáveis apresentaram halo ao redor da colônia, nas temperaturas de 28°C e de 37°C, indicando a capacidade de produção de lipases (Figura 5).

Roveda et al. (2010) estudou 21 isolados fungicos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*, observou que desses 9 fungos, espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, mostraram os melhores resultados quanto à atividade de lipase em meio sólido, utilizando azeite de oliva como fonte de carbono. Wenzel, et al., (2013) avaliou o potencial enzimático de 24 fungos endofíticos isolados de soja, *Botryotrichum* sp. *Aspergillus* sp. *Nigrospora* sp. *Bipolaris* sp. *Acrospeira* sp. *Phomopsis* sp. *Scopulariopsis* sp. *Mucor* sp. *Alternaria* sp. *Leptosphaerulina* sp. *Penicillium* sp. *Trichothecium* sp. *Papulaspora* sp. *Fusarium* sp., para a produção de lipase em meio sólido, nenhum dos isolados apresentaram atividade da enzima.

Todas as culturas que apresentaram atividade de lipase em meio sólido foram selecionadas para avaliação quantitativa da produção de lipases, utilizando três substratos como fonte de carbono.

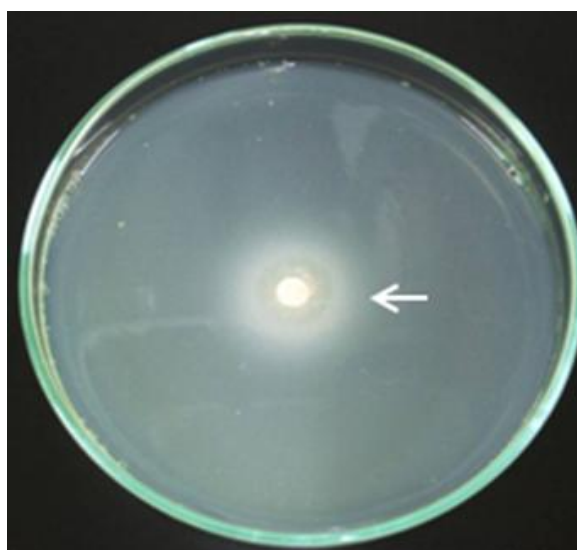


Figura 5. Halo de degradação Tween 20 ao redor da colônia, indicando capacidade de produção de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630.

5.3. AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Trichosporon*

Todas as 50 culturas testadas produziram lipases através de fermentação submersa, utilizando três diferentes substratos: óleos de oliva (*Olea europaea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.). Quando o substrato lipídico foi o óleo de oliva, as atividades variaram entre 7,76 (URM 4437) e 32,63 (URM6630) U/mL. Quando óleo de mamona foi utilizado como substrato, a máxima produção de lipase foi observada por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 com 34,03 U/mL, e a menor produção foi por *Trichosporon cutaneum* URM 4973, com 13,08 U/mL. Porém, o óleo de licuri apresentou-se como melhor indutor da produção de lipases pelas culturas testadas. A mínima atividade observada foi de 15,32 U/mL por *Trichosporon cutaneum* URM 2606. Como melhor produtor de lipases, *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 foi selecionado para estudos de otimização da produção enzimática, utilizando óleo de licuri como substrato com a maior atividade lipolítica (39,85 U/mL) dentre todos os substratos e micro-organismos testados.

A capacidade da produção de lipases por leveduras, vêm sendo amplamente reconhecida pela literatura. Ciafardini et. al., (2006) testaram *Saccharomyces cerevisiae* 1525 e *Williopsis californica* 1639 para a produção de lipases e ambas as leveduras demonstraram uma boa produção desta enzima. Coton et al. (2006) avaliaram a produção de lipases, através de 137 isolados de leveduras, utilizando óleo de oliva como substrato. Das 137 culturas, 11 produziram a enzima, com destaque para *Pichia anomala*, *Candida boidinii* e *Debaryomyces etchellsii*. No presente estudo, das 50 culturas de *Trichosporon* testadas, todas produziram lipases.

Dalmau et al., (2000), avaliando a produção de lipases por *Candida rugosa*, utilizaram diferentes fontes de carbono e verificaram que os maiores rendimentos de enzima foram obtidos com lípidios e ácidos graxos como fonte de carbono. Neste estudo os autores verificaram uma baixa produção de lipase com os substratos testados. O Tween 80 estimulou a produção de lipase de 0,4 U/mL e o ácido palmítico de 5,3 U/mL, bem abaixo dos resultados aqui obtidos com *T. sporotrichoides* URM6630 utilizando óleo de licuri como substrato.

Avaliando 199 isolados de leveduras principalmente dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces*, Batista-Gallego et al., (2011), observaram altos níveis de β -glucosidase e esterase. De acordo com autores, para a espécie *Wickerhamomyces anomalus*, que obteve os melhores resultados, foi observada uma elevada atividade para esterase e β -glucosidase, mas moderada para a lipase.

O potencial de linhagens pertencentes ao gênero *Trichosporon* para a produção de lipases, tem sido relatada na literatura (Santos et al, 2007; Zhang & Liu, 2010). Este potencial deve-se a sua

alta especificidade por acilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição 9 (Sugihara et al., 1994). Macêdo et al. (1997) testaram a produção de lipases por *Trichosporon* sp. sob fermentação submersa em meio composto por farinha de soja e trigo em pó como fontes de carbono. Os autores observaram baixos níveis de atividade total 6,22 U/mL. No presente estudo, utilizando óleo de mamona (*Ricinus communis*. L.) e sob o mesmo processo fermentativo, *T. sporotrichoides* URM 6630 mostrou-se mais promissor ao produzir 39,85 U/mL, no screening inicial. Desta forma o *T. sporotrichoides* URM 6630 foi selecionado para otimização e caracterização enzimática, sendo para esta espécie é o primeiro relato da produção de lipases.

5.4. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630

5.4.1. Design Plackett-Burman (PB)

5.4.1.1 Análise estatística dos componentes do meio para a produção de lipases no planejamento PB

O uso de modelos estatísticos para otimizar o meio, os componentes do meio de cultura e outras condições de cultivo, aumentou na biotecnologia moderna devido à sua propensão e relevância. No presente estudo, os componentes de cultura necessários para a produção de lipases foram selecionados usando o projeto PB. Com base no design PB, cada componente foi examinado em dois níveis: "-1" para baixo e nível '+1' para cima, testados em 11 variáveis, obtendo um conjunto de 12 ensaios experimentais (ver tabela 1 e 2 na seção materiais e métodos). Os resultados de atividade para estes 12 ensaios estão apresentados na figura 6.

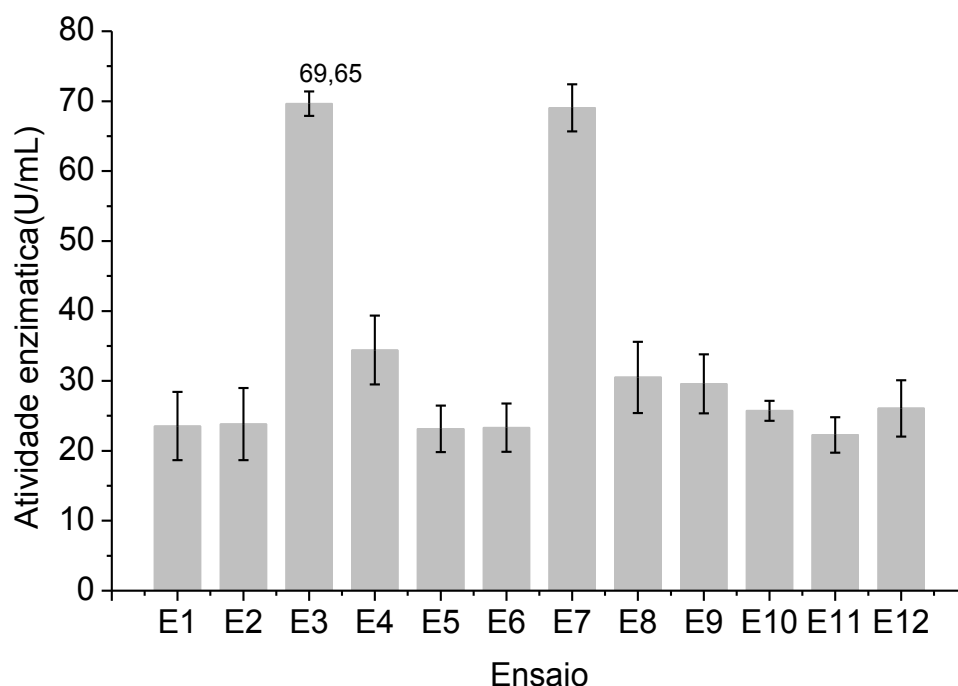


Figura 6. Gráfico de atividade enzimática para os 12 ensaios do planejamento Plackett-Burman (PB).

Após obtenção dos resultados de atividade enzimática e utilizando o pacote de software estatístico 7, foi possível a identificação e seleção das variáveis mais significativas. A Figura 7 apresenta os efeitos individuais para a produção das lipases, e os dados evidenciam que das 11 variáveis utilizadas para a fermentação, as variáveis tempo de incubação, pH, tamanho do inóculo, concentração de extrato de levedura, cloreto de sódio, sulfato de amônio, não foram estatisticamente significativas para a produção das lipases. As variáveis concentração de óleo licuri e rotação influenciaram significativamente a produção enzimática de forma negativa. As variáveis temperatura, cloreto de cálcio (CaCl_2) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) influenciaram de forma positiva a produção lipolítica.

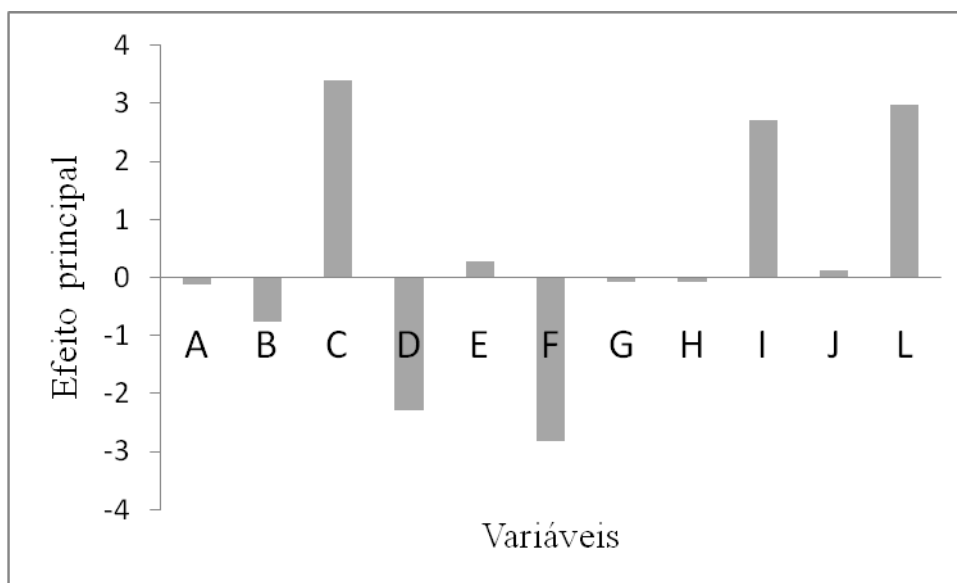


Figura 7. Gráfico dos efeitos individuais para a produção das lipases em fermentação submersa por *T. sporotrichoides* URM6630 (A, Tempo de incubação; B, pH; C, Temperatura; D, Rotação; E, Tamanho do inoculo; F, óleo; G, Extrato de levedura; H, Cloreto de sódio; I, Cloreto de cálcio; J, Sulfato de amônio; L, fosfato de potássio).

Na avaliação estatística do efeito das condições de temperatura e concentrações de óleo e de KH_2PO_4 na atividade lipolítica, através da observação do gráfico de Pareto (Figura 8) verificou-se o efeito principal ou de primeira ordem e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre as variáveis respostas, em ordem de magnitude. O comprimento das barras é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos, pois as barras que se estendem através desta linha correspondem aos níveis de significância de 95%.

Observou-se que, os efeitos significativos das variáveis estudadas, assim como as interações entre estas, a variável temperatura (1) apresentou o maior efeito positivo (95%) sobre a atividade lipolítica, isto é, aumentando a temperatura de incubação do meio de cultivo favoreceu o aumento da atividade enzimática. A concentração do óleo de licuri apresentou efeito negativo, com nível de confiança de 95%. A relação entre a temperatura e a concentração de KH_2PO_4 , (1x3) interagiram de forma positiva. A interação entre a temperatura e a concentração de óleo de licuri, (1x2) interagiram de forma negativa e as interações das demais variáveis em estudo não foram significativas.

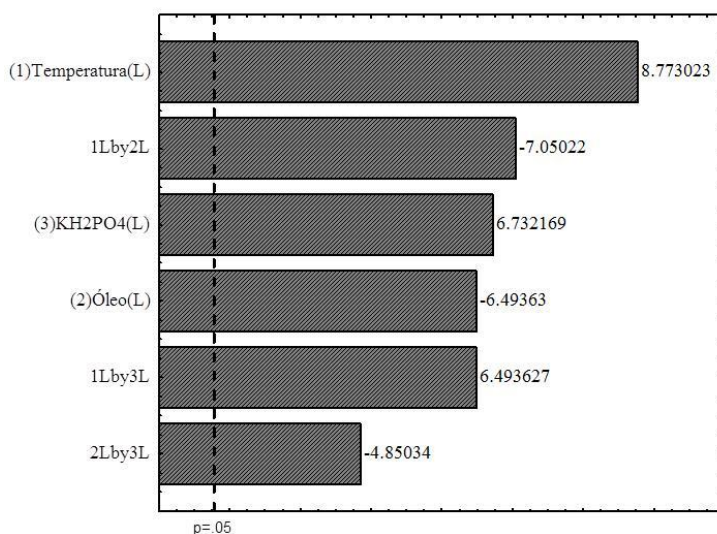


Figura 8. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a produção das lipases baseados nos resultados experimentais Plackett-Burman (PB).

Durante todas as análises foi observado um padrão similar dos efeitos das variáveis, mesmo em tempos de fermentação diferentes. Observou-se na Figura 9 que a temperatura foi o parâmetro mais significativo para a produção de lipases por *T. sporotrichoides* URM 6630. O efeito da concentração do óleo de licuri foi significativo e negativo, ou seja, uma pequena concentração do indutor (0,5%) favoreceu a produção de lipases pelo micro-organismo em estudo. A adição do extrato de levedura ao meio não foi significativa para a produção enzimática por *T. sporotrichoides* URM 6630, sendo este um nutriente de maior custo. Portanto, em caso de produção industrial, a ausência deste no meio minimizará os custos da produção.

Utilizando planejamento PB como ferramenta estatística, Gopinath et al. (2003) otimizaram a produção de lipases por *Geotrichum candidum*. Os autores observaram sete variáveis que influenciaram (tempo de incubação, pH, temperatura, galacose, sulfato de amônio, nitrato de sódio e Tween-80) a produção de lipases pela linhagem analisada.

Visando otimizar ainda mais a produção de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630, as condições aplicadas no ensaio 3 do planejamento PB foram selecionadas para serem utilizadas na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Neste ensaio, o micro-organismo produziu 69,65 U/mL de lipases.

5.4.2. Otimização das variáveis significantes usando Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é aplicada em experimentos industriais para encontrar condições ótimas para fatores de delineamento. É atualmente, o mais difundido conjunto

de técnicas para otimizar, sendo composta de duas etapas: modelagem e deslocamento (Basheer et al., 2011). A MSR foi adotada através da seleção das variáveis significativas: temperatura, óleo de licuri e KH_2PO_4 . Na Tabela 8 estão descritos os valores da atividade lipásica (U/mL) obtidos no experimento da MSR, evidenciando que as melhores condições para a produção da lipase por fermentação submersa por *T. sporotrichoides* URM 6630 encontra-se no ensaio 12 composto: óleo de licuri (0,75% v/v), KH_2PO_4 (1% p/v) e incubados em 34°C. Neste ensaio a atividade de lipase experimental foi de 104,07 U/mL, resultado aproximadamente cinco vezes maior que os encontrados por Salihu et al. (2011) que trabalharam com a levedura *Candida cylindracea* utilizaram Tween-80 como fonte de carbono e obtiveram uma atividade lipásica de 20,26 U/mL após a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta.

Basheer et al. (2011) avaliaram a produção de lipases por linhagem de *Aspergillus awamori* utilizando óleo de arroz como substrato. Os autores obtiveram máxima produção das enzimas com (2% v/v) de óleo e 0,05 de KH_2PO_4 . No presente estudo, a concentração do óleo de licuri influenciou negativamente a produção das lipases. Enquanto que o acréscimo do KH_2PO_4 no meio promoveu o aumento da atividade da enzima e sua interação com o óleo de licuri diminuíram a atividade das lipases

Pinheiro et al (2008) produziram lipases por *Penicillium verrucosum* em fermentação submersa utilizando o mesmo modelo experimental e um meio acrescido de peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e azeite de oliva obtiveram, após 96 horas, atividade de 3,15 U/mL. Puthli et al. (2006), que avaliaram a produção de lipases por *Candida rugosa*, obtendo-se uma atividade máxima de 1,84 U/mL após um período de 66 horas de fermentação. Santos et al, (2007) trabalhando com *Trichosporon spp* conseguiram uma produção de lipase de 7,3 U/mL após 72 horas de cultivo. Todos esses resultados estão bem abaixo dos encontrados no presente estudo com o *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630.

Tabela 8. Desenho experimental e resultados da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Ensaio	Temperatura	Óleo	KH ₂ PO ₄	Atividade lipolítica U/mL	
				Experimental	Esperada
1	1	1	1	74,22	88,80
2	1	1	-1	50,04	58,00
3	-1	-1	1	49,20	63,38
4	1	-1	-1	64,22	65,02
5	0	0	0	68,15	71,73
6	0	0	0	14,92	71,73
7	0	0	0	14,05	71,73
8	0	-α	0	74,22	68,00
9	0	0	-α	47,61	47,36
10	1	-1	1	69,05	84,87
11	-α	0	0	77,96	62,28
12	0	0	+α	104,07	82,18
13	0	0	0	73,72	71,73
14	0	0	0	14,57	71,73
15	-1	1	-1	55,22	61,59
16	-1	-1	-1	51,79	59,35
17	+α	0	0	88,75	80,19
18	0	+α	0	88,20	74,17
19	-1	1	1	55,22	76,56
20	0	0	0	73,72	71,73

Atividade enzimática ± padrão de derivação

A análise de variância indicou que o modelo estabelecido foi significativo ($P = 0,28$). Na maioria dos estudos a análise ANOVA geralmente mostra um resultado significativo originando um modelo experimental quadrático (Gopinath et al., 2003; Singh and Satyanarayana, (2008); Salihu et al., 2011). A análise ANOVA para a produção da lipase neste estudo mostrou que só o modelo matemático linear foi significativo, obtendo uma equação polinomial de primeira ordem (Tabela 9).

Tabela 9. Análise de variância da ANOVA da produção de lipases por *T. sporotrichoides* utilizando óleo de licuri como fonte de carbono

	SS	df	MS	F	P
(1)Temperatura(L)	12,9671	1	12,96713	3,56265	0,117738
(2)Óleo (L)	1,5396	1	1,53964	0,42301	0,544137
(3)KH₂PO₄(L)	49,0337	1	49,03369	13,47174	0,014438
Lackof Fit	108,1235	11	9,82941	2,70058	0,141333
PureError	18,1987	5	3,63974		
Total SS	189,8627	19			

As Figuras 9a, b e c, apresentam os gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais: óleo de licuri e K₂HPO₄, temperatura e K₂HPO₄, e óleo de licuri e temperatura. Pode-se verificar que as melhores condições para a produção das lipases em

fermentação submersa por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 apresentaram-se durante a relação entre a concentração de KH_2PO_4 e a concentração de licuri, que interagiram de forma positiva.

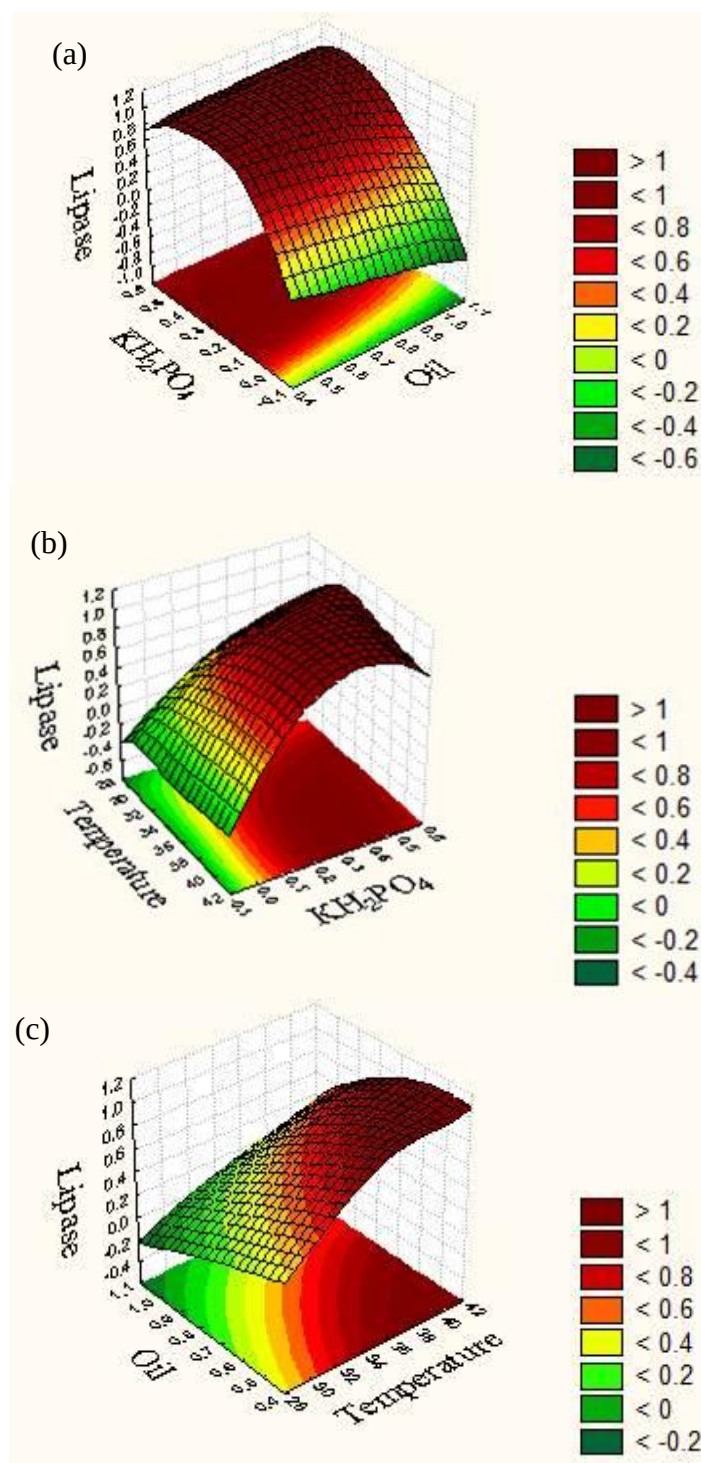


Figura 9. Gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a produção de lipases por *T. sporotrichoides* URM6630 (a) óleo de licuri e K_2HPO_4 , (b) temperatura e K_2HPO_4 , e (c) óleo de licuri e temperatura.

Basheer et al. (2011) trabalhando com a MSR verificaram que das variáveis testadas, o tempo de incubação e temperatura foram as mais significativas. Tais resultados diferem dos obtidos no presente estudo, no qual apenas a interação entre a concentração de KH_2PO_4 e a concentração do óleo de licuri foi significativa. Gopinath et al. (2003) trabalharam com *Geotrichum candidum* e otimizaram a produção das lipases usando a MSR. Os autores obtiveram atividade máxima de lipases de 87.7 U/mL, entretanto com substrato mais complexo com galactose (1,25% p/v), fonte de nitrogênio (2% p/v), Tween-80 (1% v/v), temperatura de 30 °C e elevado tempo de incubação (144 horas).

6.5. PURIFICAÇÃO DA LIPASE EM SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

6.5.1. Efeito do peso molecular de PEG sobre a partição de lipase

Os melhores resultados de purificação da lipase após análise estatística foram obtidos na fase superior, ou seja, fase onde se encontra o polietileno glicol (PEG). Também de acordo com essa análise o PEG com peso molecular de 10000, com maior concentração 24% além do sal fosfato de potássio 20% pH 8.0 proporcionaram a separação da lipase presente no extrato bruto preferencialmente para a fase superior (“fase top” composta por PEG) do sistema. Nessas condições obtivemos um coeficiente de partição de 76 (figura 10) e uma recuperação da atividade de 164,71%, no entanto o aumento de pureza que foi de 0,96 indica que faz-se necessário um outro planejamento estatístico para aumentar a pureza enzimática. Show et al, (2012) obtiveram uma recuperação de 75% conseguindo dobrar a média da purificação após duas recuperações seguidas da fase superior. Ooi et al, 2011 trabalharam com sistema aquoso de duas fases verificaram que a enzima estava acumulada na fase superior e a recuperação foi de 92,1% e o coeficientes de partição 0,34. Após repetitiva recuperação da enzima os autores obtiveram um aumento na concentração da enzima 16,5 U/ml e do fator de purificação 7,2.

No Sistema de duas fases aquosas, conhecido como SAB, a escolha do sal é de extrema importância, pois o teste possui um importante papel como formação da fase e uma relação direta na separação, concentração e purificação da enzima, influenciando no sistema. Segundo, Nandini & Rastogi (2011), um sistema de fosfato de potássio demonstrou ser mais apropriado para lipases, enquanto que o citrato de sódio mais adequado para a protease. Esses mesmos autores utilizaram SAB consistindo de PEG massa molar 6000 e fosfato de sódio, observaram que a enzima ficou concentrada na fase superior do sistema, conseguiram um coeficiente de partição 0,25, recuperação 92%, fator de purificação de 1,87, e a pureza da lipase foi aumentada em 3,59 vezes utilizando várias extrações das fases.

Santos *et al* 2007, trabalhando com *Trichosporon* spp, observaram que o sistema PEG e fosfato apresentou um bom potencial para a extração da enzima, concentrada na fase superior, com uma rápida e elevada recuperação de 99,8%. Khayati & Alizadeh, 2013 realizando a extração da lipase, também por sistema de duas fases, produzida pela fermentação da levedura *Rhodotorula glutinis* verificou que a enzima ficou concentrada na fase superior com uso de PEG de 4000, obtiveram o coeficiente de partição (68,8%) e o fator de purificação (8,63).

Bassani *et al*, 2010 purificando a lipase de *Candida rugosa* conseguiu concentrar esta enzima na fase superior, obtiveram um fator de purificação de 2,3 e recuperação da enzima de 78,26% com um PEG de massa molar de 2000. Aradhana, *et al*, 2014 utilizando a lipase de *Rhizopus niveus* em sistema de duas fases aquosas observaram que uma baixa massa molar de PEG favoreceu a separação lipase para a fase superior, o que difere do nosso estudo conforme Figura 10 (a, b e c).

Padilha *et al* 2011, utilizaram diferentes massas molares de PEG (1500, 4000 e 6000) a uma concentração de 50% p/p em tampão fosfato (pH 6, 7 e 8) verificaram que menores concentrações de soluções são necessárias para a formação de fases com PEG de maior massa molar, como ocorrido em nosso trabalho, onde conseguimos formação das fases com concentrações 20, 22 e 24% p/p do PEG 6000, 8000 e 10000. Zhang & Liu, 2010 submeteu *Trichosporon laibacchii* a purificação parcial por sistema de duas fases aquosas, com SAB consistindo de PEG 4000 (12%) e fosfato de potássio (K₂HPO₄, 13%) resultou na partição da lipase para a fase de PEG com coeficiente de partição 7,61, recuperação de actividade de 80,4%, e o factor de purificação de 5,84 a um pH de 7,0. Em todos os casos relatados o rendimento da recuperação da atividade enzimática foi menor do que o obtido em nosso estudo. Como observado em nossos resultados, a massa do PEG foi a variável que teve uma influência mais significativa, entretanto todas as variáveis influenciaram significamente o estudo, o que remete a necessidade de um novo planejamento para tentar aumentar ainda mais a pureza da enzima produzida pelo *Trichosporon sporotrichoides*.

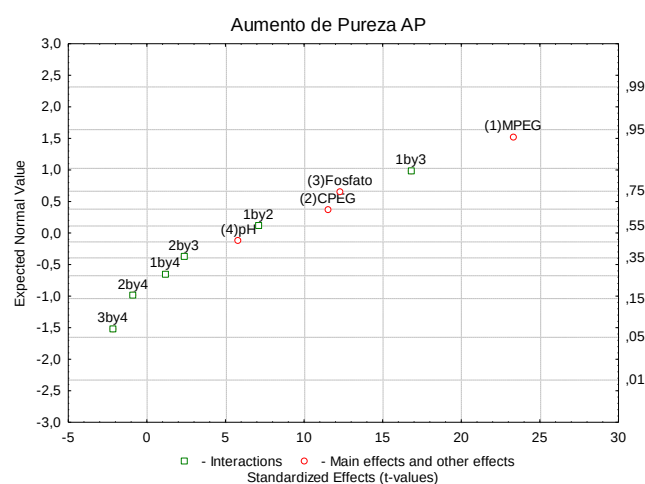
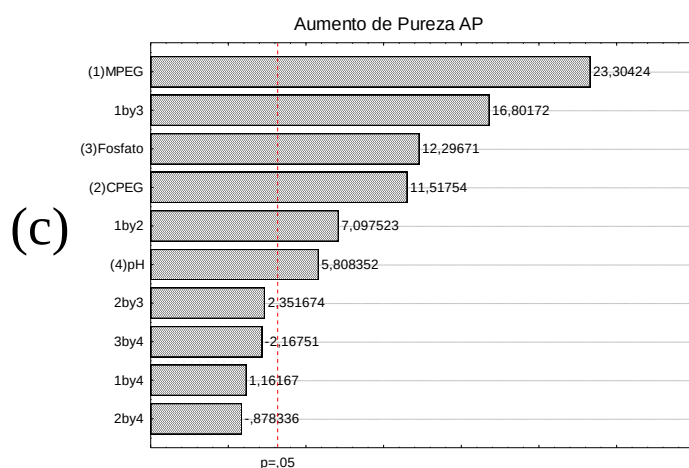
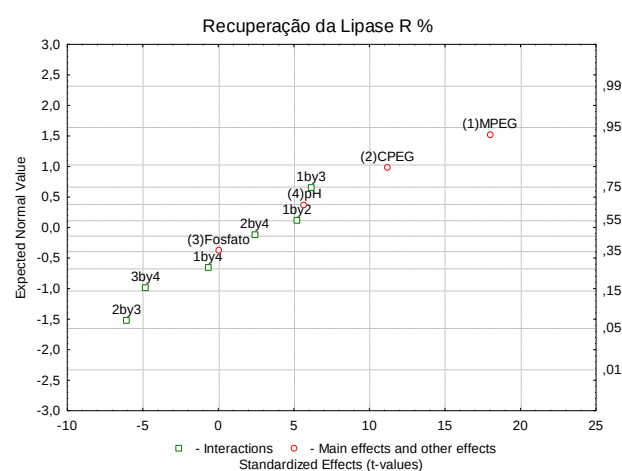
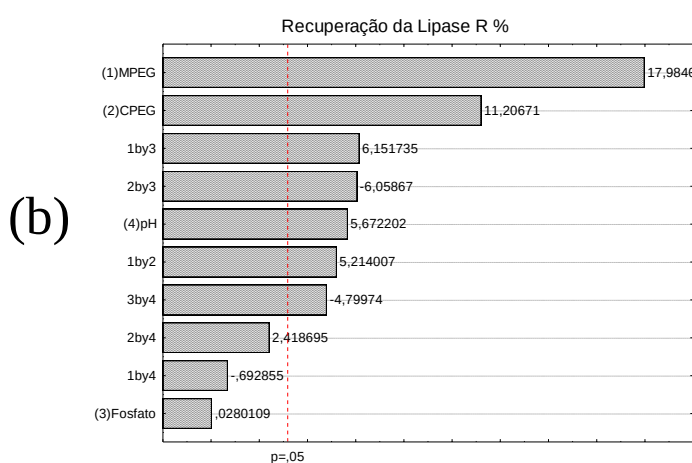
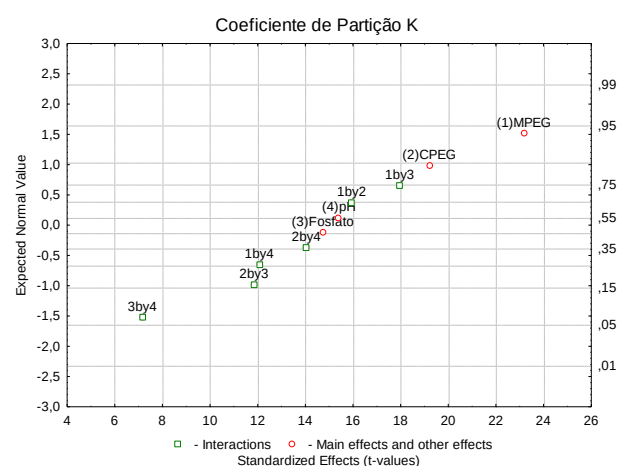
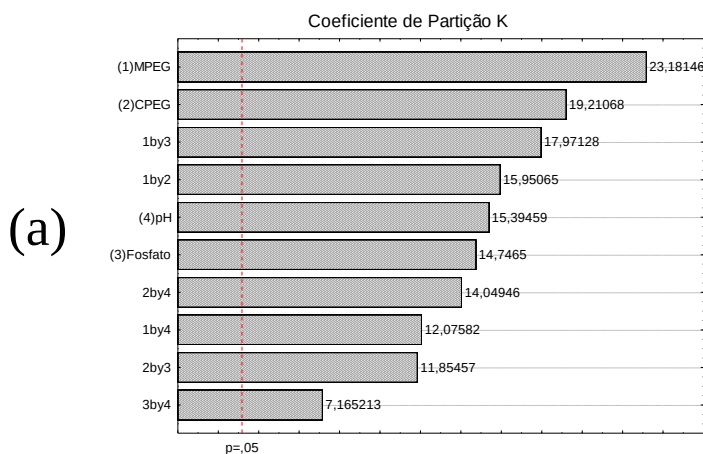


Figura 10 Gráficos de pareto e de efeitos, mostrando a influência das variáveis sobre os seguintes parâmetros: (a) coeficiente de partição (K) da enzima; (b) no rendimento de recuperação da enzima; (c) aumento da pureza.

Nota: MPEG: Massa do PEG; CPEG: concentração de PEG.

6.6. CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA

6.6.1. Efeito e Estabilidade da lipase ao pH e à temperatura

Os estudos de pH e temperatura são importantes na etapa de purificação da lipase, impedindo a perda de atividade pelo uso de condições que favoreçam sua inativação e redução da eficiência do método de purificação. Além disso, as avaliações dos efeitos e estabilidade de pH, temperatura e outras variáveis sobre a atividade enzimática podem ser úteis para uma futura transposição de escala industrial em biotecnologia. Em nossos ensaios, o efeito do pH na atividade lipolítica apresentou ótima atividade em pH 10,0 (figura 11a). Diferentes estudos na literatura tem demonstrado uma ampla faixa de estabilidade de lipases produzidas por fungos em diferentes faixas de pH [3,0 a 10,0 (Dharmsthiti *et al*, 1997); 6,5 a 8,5 (Gopinath *et al*, 2013); 2,0 a 12,0 (Jermstuntica *et al*, 2011)]. Singh *et al.*, (2009), encontraram para *Geotrichum candidum* melhor atividade em pH 5,4. O valor de pH ótimo está de acordo com os dados obtidos na literatura que descrevem numa faixa de 2,0 a 10,0 (Martins, 2001; Mahadik *et al.*, 2002; Pastore *et al.*, 2003).

Pinheiro *et al* (2006), obteve pH ótimo de 7,0 para lipases produzidas em fermentação submersa de *Penicillium verrucosum*. Os estudos de Kumari *et al* (2012) e Yu *et al* (2007) trabalhando com a levedura *Yarrowia lipolytica* observaram uma atividade ótima com os valores de pH 7,0 e 8,0, respectivamente. Ciafardini *et al* (2006) produziram lipases utilizando amostras de *Williopsis californica* 1639 e *Saccharomyces cerevisiae* 1525 obtendo valor de pH ótimo de 6,0 e 7,5. Estes dados reforçam que as características das enzimas microbianas variam de acordo com a enzima em estudo, linhagem produtora, bem como com as condições de fermentação (Kumari *et al* 2012).

Já em relação ao efeito da temperatura sobre a atividade da lipase de *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 obtida em nosso estudo e apresentada na figura 11b, pôde-se verificar que este efeito foi maior a 40°C. A mesma temperatura ótima foi observada por Singh *et al* (2009), ao caracterizar lipases produzidas por *G. candidum*, e Kumari *et al*, (2012) com lipase produzida por *Yarrowia lipolytica*. Quanto à estabilidade em função do tempo (figura 12a e 12b), a lipase aqui obtida por *T sporotrichoides* URM 6630 mostrou-se termoestável à temperatura de 40 por até 4 horas de incubação, e em relação ao pH 10,0 a estabilidade foi mantida praticamente inalterada por até 120 minutos. Pinheiro e colaboradores em seus estudos para a produção de lipases verificaram que as melhores temperaturas para uma elevada atividade lipolítica foi no intervalo entre 30 a 40 °C. Contudo no trabalho de Ciafardini e colaboradores, 2006 que utilizaram as leveduras *Williopsis californica* 1639 e *Saccharomyces cerevisiae* 1525 para produzir lipases, a temperatura para uma maior produção da enzima foi de 20 °C e 30°C respectivamente.

Dimitrijevic e colaboradores 2012, trabalhando com a levedura *Candida antarctica* obtiveram 60°C como temperatura ótima para a enzima. Santos et al, 2007 trabalharam com o mesmo Gênero desse estudo *Trichosporon spp* e obtiveram temperatura ótima para a atividade lipolítica entre 45-50 °C. Padilha *et al*, 2011 verificaram que a lipase obtida após purificação apresentou atividade ótima a 37 °C e pH 8,0. A inativação da lipase ocorreu durante 60, 90 e 120 minutos a 50 e 60 °C respectivamente, 34, 33 e 45%. Quanto ao pH, a enzima mostrou estabilidade durante 4 h de incubação a diferentes valores de pH. Os nossos resultados reforçam os dados da literatura de que fatores como a origem e linhagem microbiana podem interferir diretamente nas propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas. Além de tais fatores, as condições do ensaio, tempo de incubação, pH, temperatura, metodologia e o substrato utilizado também são importantes determinantes das características enzimáticas (Lopez et al., 2012; Carvalho et al., 2005).

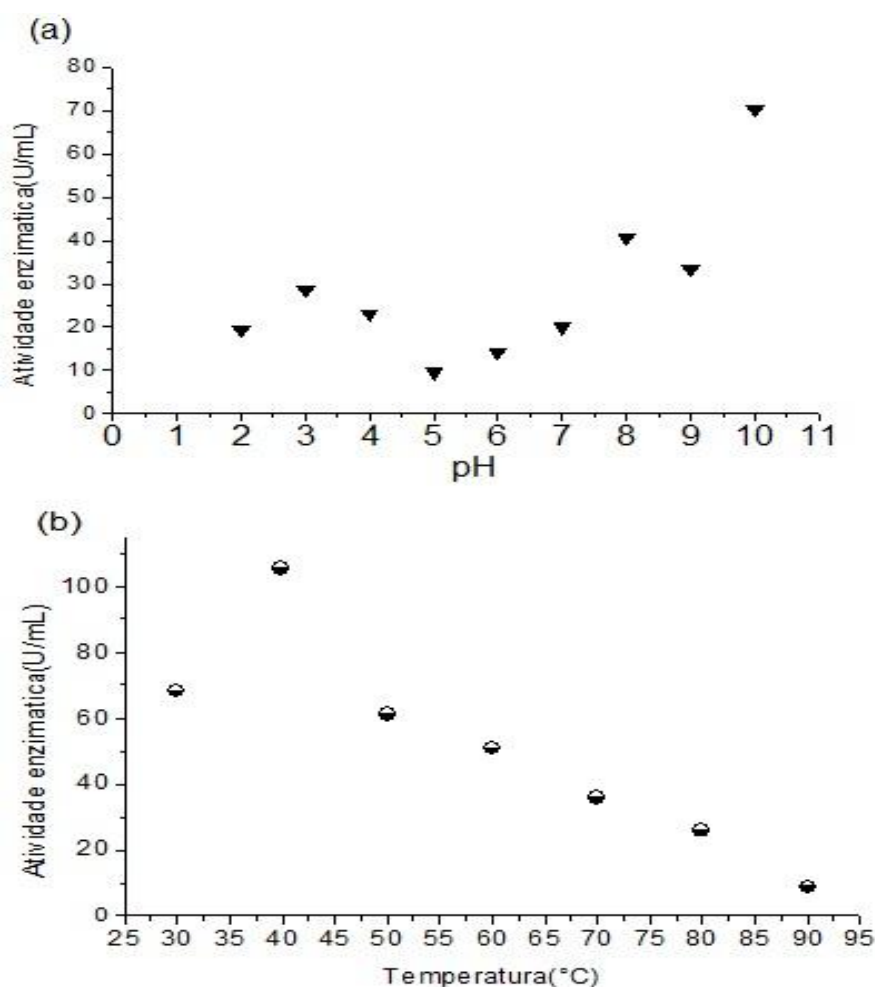


Figura 11. Efeitos de pH e temperatura sobre a atividade enzimática após purificação utilizando sistema de duas fases aquosas.

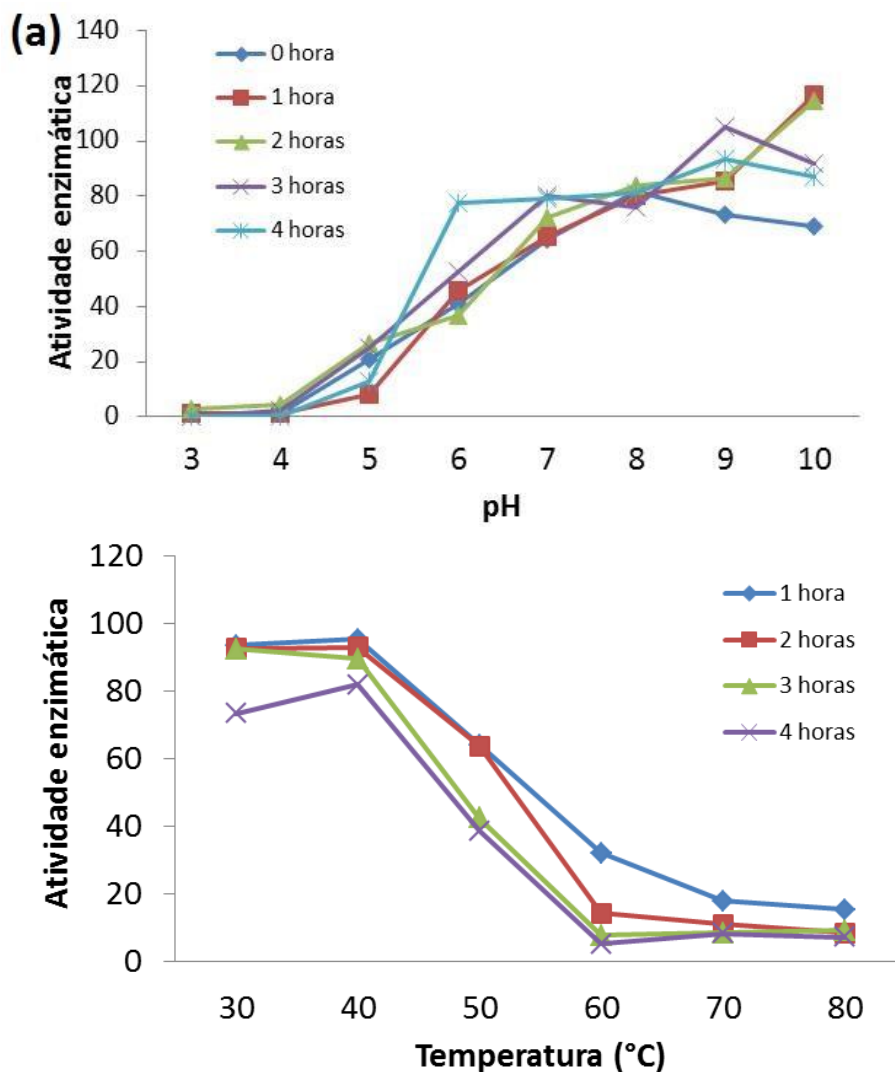


Figura 12. Estabilidade ao pH e à temperatura sobre a atividade enzimática Após purificação utilizando sistema de duas fases aquosas.

6.6.2. Efeito de íons metálicos, inibidores e solventes sobre atividade lipase

A enzima teve sua atividade ativada por sulfato de cobre, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, sulfato de zinco e sulfato de manganês. A lipase foi inibida por pepstatina. O isopropanol e o DMSO (dimetilsulfóxido) não alteraram a atividade da enzima. O EDTA (ácido etileno-diamino-tetraacético) inibiu consideravelmente a lipase, o que indica que a enzima é uma metaloprotease. Todos os resultados estão apresentados na figura 13. Kumari e Gupta (2012), trabalhando com a levedura *Yarrowia lipolytica*, suas atividades lipasicas foram ativadas por Ca^{2+} e inibidas por Fe^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} . O Mg^{2+} não afetou a atividade enzimática.

Yu *et al.* (2007), *Yarrowia lipolytica* Obtiveram que com acetona, metanol, etanol, isopropanol, DMSO a lipase reteve atividade quase 90% e a atividade de lipase foi ligeiramente aumentado por Ca^{2+} e Mg^{2+} . A atividade da lipase foi inibida por Zn^{2+} e Ni^{2+} e totalmente inibida por Cu^{2+} , mas não foi afetada pelo agente quelante EDTA, sugerindo que este não é uma lipase metaloenzima. A adição de 0,1% de Tween 80 e Span 65 aumentou ligeiramente a atividade da enzima, depois de 0,5 horas a 30 ° C; Triton X-100, Span 85, DTT e β -mercaptoetanol não afectam a actividade de lipase; mas SDS 1 mM teve um forte efeito inibitório na atividade da lipase. Padilha *et al*, 2011 verificaram que os íons metálicos, tais como Mn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} e I^- mantiveram a atividade enzimática da lipase, no entanto, na presença de Fe^{2+} , Hg^{2+} e Al^{3+} a enzima foi completamente inibida.

Dimitrijevic *et al*, (2012), trabalharam com outro gênero de levedura, a *Candida antarctica* verificando o efeito de diversos íons (Na^+ ; K^+ ; NH_4^+ ; Zn^{2+} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Cu^{2+} ; Mn^{2+} e Fe^{2+}) e detergente na atividade enzimática. Neste estudo os autores observaram o efeito desestabilizador do cálcio. Em concentrações baixas (0,1%), a lipase não foi afetada por Triton X-100, Triton 1339, Tween 20 e Tween 80. Em concentrações mais elevadas, a atividade foi inibida, exceto no caso de Triton X-100. Nenhum dos detergentes testados atuou como ativador da lipase.

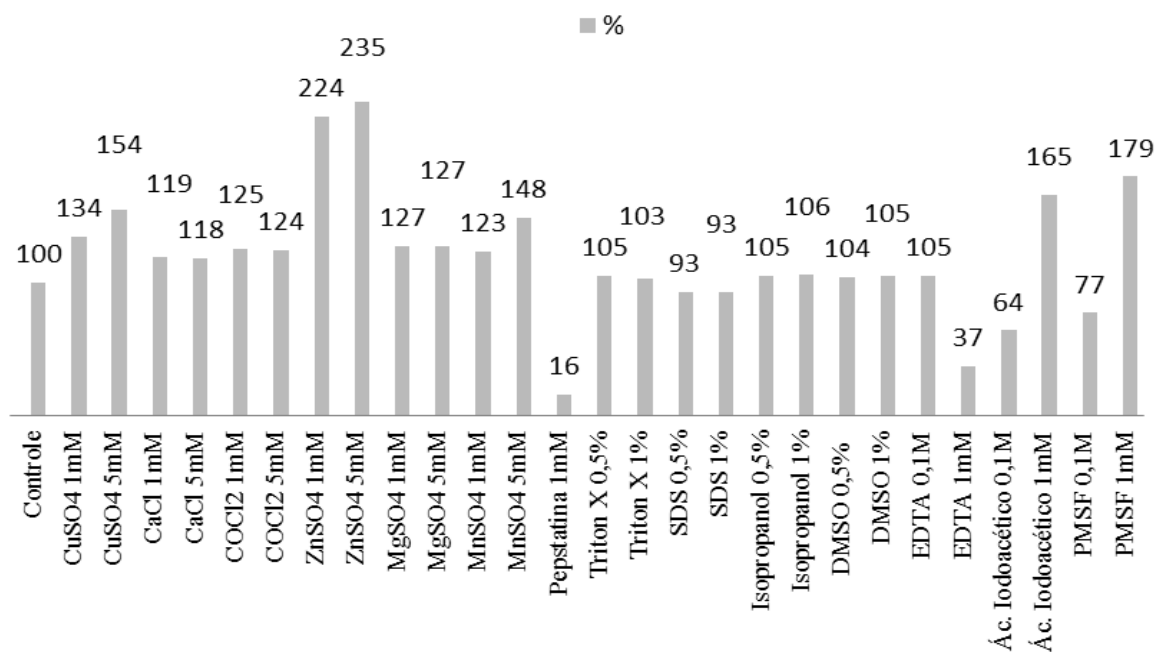


Figura 13. Gráfico dos efeitos dos inibidores sobre a atividade lipolítica em valor percentual.

6.7. APLICAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA POR *T sporotrichoides* URM 6630 NO TRATAMENTO DO EFLUENTE DE ABATEDOURO DE BOVINOS

6.7.1. Caracterização físico-química do efluente e aplicação do extrato enzimático bruto

Amostras do efluente de abatedouro de bovino, utilizado em todos os experimentos foram analisadas pelo Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP). Os resultados da análise físico-química estão descritos na tabela 10. Podemos verificar em tais resultados a elevada quantidade de material orgânico relacionado diretamente com a demanda química de oxigênio e o teor de lipídeos na amostra, com óleos minerais e gordura animal, o que torna interessante e viável os ensaios com as lipases produzidas por *T sporotrichoides*.

Tabela 10. Análise físico-química do efluente

<i>Parâmetros</i>	<i>Resultados</i>	<i>Unidade</i>
Demanda Química de Oxigênio	1.107	mg O ₂ /L
Sólidos Totais	1.228	mg/L
Óleos e Graxas Totais	136	mg/L
Óleos e Graxas Minerais	108	mg/L
Óleos e Graxas Vegetais e Gordura Animal	28	mg/L
Sólidos Suspensos Voláteis	52,5	mg/L

Os resultados da ANOVA indicaram que o planejamento foi significativo. O erro experimental foi avaliado através de ensaios em quaduplicata, de forma aleatória dos pontos centrais do design experimental. Os resultados mostraram uma boa reprodutibilidade ($p < 0,5$). O efeito dos fatores na hidrólise enzimática utilizando a lipase produzida pelo *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 pode ser observado nos gráficos de Pareto apresentados na Figura 14.

Oliveira *et al.* (2011) em seus estudos observaram que com o aumento da adição de lipase aumentou a hidrólise de lipídios, obtendo os melhores resultados utilizando as concentrações de 1,0 e 1,5 g L⁻¹ desta enzima. Rigo *et al.* (2008) em seus estudos utilizando o extrato enzimático obtido da fermentação em estado sólido usando *Penicillium restrictum* obtiveram após 15 h de reação melhores resultados com 5.0% (p / v) de lipase, a temperatura de 45 °C, com um pH (6,0) e sem agitação. E para a enzima comercial (Lipolase 100T) os melhores resultados foram obtidos com condições temperatura (36 ° C) e enzima (2.55% p / v), esses últimos resultados corroboram com os resultados encontrados em nossos estudos, onde a menor concentração enzimática, promoveu a melhor hidrólise dos ácidos graxos 2.0% (p / v) do extrato enzimático bruto.

As variáveis que influenciaram na quebra dos ácidos graxos livres foram temperatura, quantidade da enzima e o pH. A temperatura e o pH apresentaram efeito positivo uma vez que o melhor resultado da hidrólise da lipase foi alcançado com o nível mais alto de pH 8.0 (tampão fosfato) e a temperatura mais elevada 40 °C. A concentração da enzima apresentou efeito negativo, a melhor hidrólise foi obtida com os níveis mais baixos da enzima. A interação entre as variáveis quantidade da enzima e o pH foram as que mais influenciaram a hidrólise, resultados obtidos para a temperatura foram parecidos com os obtidos por Rigo et al. (2008) cuja temperatura foi a mais elevada 45 °C.

Leal et al. (2010) encontrou as melhores condições a 45 °C depois de 24 h de incubação, utilizando a lipase de *Penicillium restrictum* para a hidrólise de águas residuais de laticínios. Os resultados encontrados no presente estudo são relevantes para uma aplicação industrial, e para a primeira etapa do tratamento dos efluentes (flotação) a temperatura utilizada varia entre 27- 40 °C.

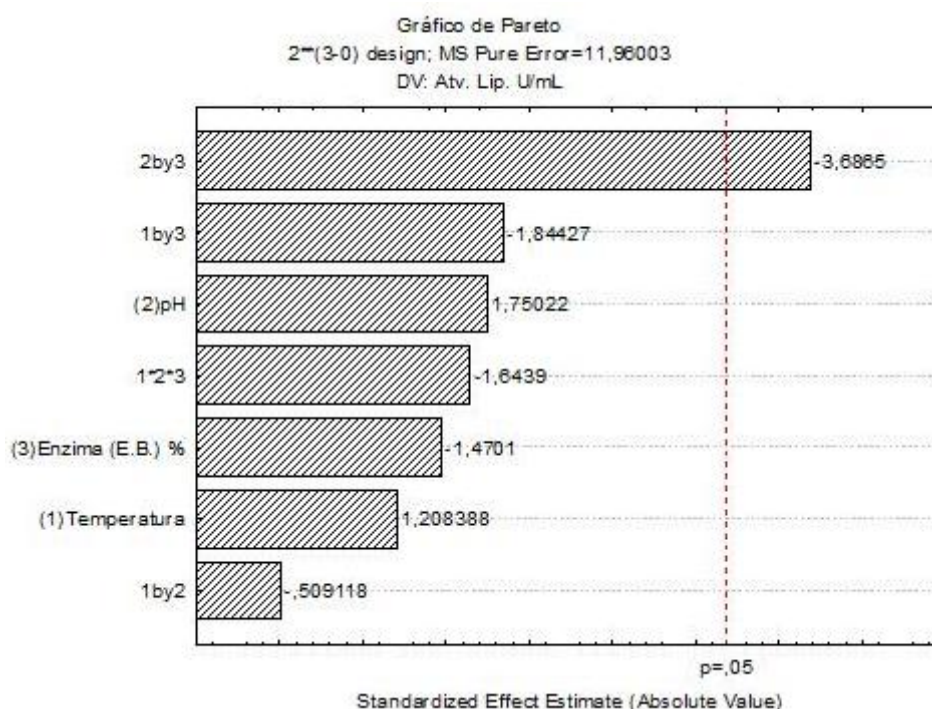


Figura 14. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a hidrólise de ácidos graxos em efluentes de abatedouro de bovinos pela lipase produzida pela fermentação submersa de *T. sporotrichoides* URM6630 em óleo de licuri.

O gráfico de superfície (figura 15) mostra que a interação entre as variáveis foram mais significativas para as variáveis concentração de enzima e valor de pH. Portanto a lipase produzida através da fermentação líquida de *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630, poderia encontrar uma

aplicação promissora na pré-hidrólise de lipídios presentes nos efluentes de abatedouros de bovinos, mas o processo de purificação desta enzima precisa ser otimizado para obtenção de um melhor rendimento.

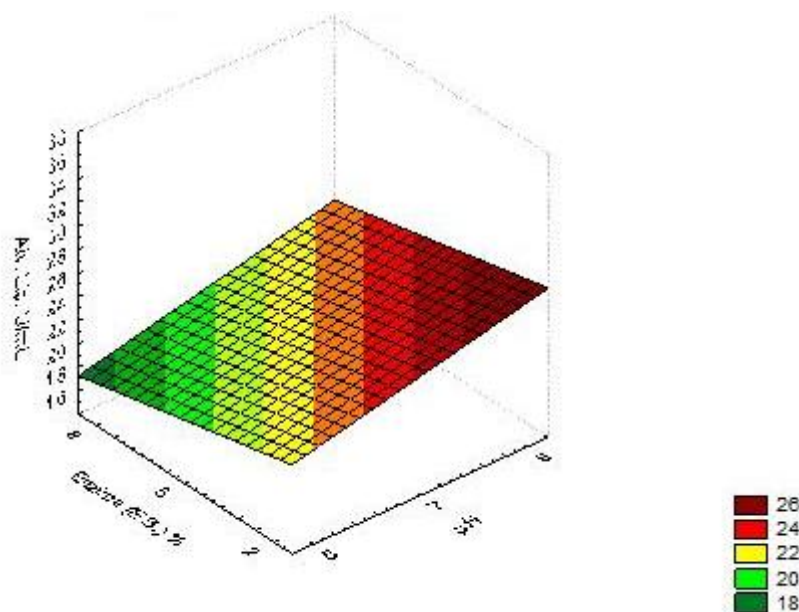


Figura 15. Gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a hidrólise de ácidos graxos livres presentes em efluentes de abatedouro de bovino, por lipases produzidas pela fermentação de *T. sporotrichoides* URM6630 em óleo de licuri.

7. CONCLUSÃO

Trichosporon sporotrichoides URM 6630, trata-se do primeiro relato de produção de lipases por uma linhagem desta espécie, bem como da utilização de óleo de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc) como substrato. Este micro-organismo torna-se bastante promissor para a produção de lipases, por produzir altos níveis destas enzimas, em temperatura moderada, utilizando substrato de baixo custo, um meio de cultura simples para a produção, minimizando assim os custos da produção. Tais resultados mostram-se promissores para a indústria, pois possibilitam economia de substrato e de tempo de produção.

O sistema PEG/fosfato provou ser adequado para a remoção da lipase do extrato bruto fermentado de *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630. As condições satisfatórias do processo de purificação em sistema de duas fases aquosas foram encontradas no ensaio 16, utilizando PEG 10000 / fosfato de potássio (24/20% respectivamente) a um pH de 8.0, que garantiu os melhores resultados coeficiente de partição 76, recuperação da atividade 164,71%, e o fator de purificação de 0,96. O SAB não é suficiente para proporcionar total purificação da enzima e de acordo com as análises estatísticas foi possível observar que apesar da recuperação da enzima em alguns ensaios

ter sido superior a 100%, nas condições utilizadas não obtivemos uma boa purificação, além disso todos os fatores estudados influenciaram na purificação da lipase por SAB de forma positiva, ou seja, quanto maior a massa e concentração do PEG, concentração do fosfato e pH maior será o aumento de pureza e a recuperação da lipase extraída do meio de fermentação. Assim faz necessário um segundo planejamento estatístico para aumentar a pureza da enzima, no entanto o SAB deve ser considerado como método de baixo custo, eficiente na etapa de descontaminação e recuperação da enzima.

A adição da enzima lipase pode aumentar significativamente a eficiência do processo de tratamento de efluente, reduzindo os impactos ambientais gerados sobre os recursos hídricos. O maior rendimento na degradação dos ácidos graxos livres, foi obtido no ensaio 7 (36,14 u/mL) com elevado nível de degradação utilizando a temperatura de (40 °C), reduzida quantidade do extrato enzimático bruto (2% m / v) e pH (8,0).

8. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto. FINEP ref. 2083/07, FACEPE APQ-0483-2.12/10 e CNPq 552410/2005-5. Ao Departamento de Micologia da UFPE e à Micoteca.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39:235–251.
- Hawksworth, DL et al Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, Wallingford; Ed. CAB International, 8 ed. p. 616. 1995
- Açikel, U., Eran, M., Açikel, Y.S. 2010. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. *Food and Bioproducts Processing* 8:31-39.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York, John Wiley.
- Alonso, F.O.M. 2001. Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

- Aradhana, D., Sreeja, H.P., Sharmila, G., Muthukumaran, C. 2014. Optimization of *Rhizopus niveus* Lipase Partitioning by an Aqueous Biphasic System. *Chemical Engineering Technology*. 37(7):1191–1197.
- Araujo, F. V. & Hagler, A. N. 2010. Yeasts Associated with Mangrove sediments in Rio de Janeiro State, Brazil. *Journal of Integrated Coastal Zone Management*. 1-9.
- Abramic M, Lescic I, Korica T, Vitale L, Saenger W, Pigac J (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 25: 522-529.
- Barbosa, L.P., Oliveira, R.L., Silva, T.M., Jesus, I.B., Garcez Neto, A.F., Bagaldo, A.R. 2012. Morfometria testicular de cabritos alimentados com óleo de licuri (*Syagrus coronata*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 64:804-809.
- Barnett, J.A., Paine, R.W., Yarrow, D. 2000. Characteristics and identification. . 3º Ed. Cambridge: Editora *Cambridge University Press*.
- Bassani, G., Fuciños, P., Picó, G., Farruggia, B. 2010. *Candida rugosa* lipase Lip1–polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 75:532–537.
- Belviso, S., Ghirardello, D., Giordano, M., Ribeiro, G. S., Alves, J. S., Parodi, S., Risso, S., Zeppa, G. 2013. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. *Food Research International* 51:39–45.
- Barros M, Fleuri LF, Macedo GA (2010). Seed lipases: sources, applications And properties – a review. *Brazil. J. Chemic. Engin.*27:15-29.
- Basheer SM, Chellappan S, Beena PS, Sukumaran RK, Elyas KK, Chadrsekaran M (2011). Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol.* 1-12.
- Bentubo, H.D.L. 2008. Leveduras do gênero *Trichosporon*: aspectos ecológicos, caracterização laboratorial, fatores associados à virulência e suscetibilidade a antifúngicos. dissertação Mestrado , Instituto de Ciências Biomédicas (ICB)
- Berrobi C, Manoussos G, Oreal SA. 1970. Cosmetic, Pharmaceutical preparations containing lipase, hyaluronidase and/or Thiomucase enzymes, *West Germany Patent* 947.896.
- Bizinoto, T. K. M. C., Oliveira, E. G., Martins, S. B., Souza, S. A., Gotardo, M. 2010. Cultivo da mamoneira influenciada por diferentes populações de plantas. *Bragantia, Campinas* 69:367-370.
- Bon et al. (org). *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado*. Rio de Janeiro, Interciência. 2008
- Borja, M.S.; Oliveira, R.L.; Ribeiro, C.V.M.R. 2010. Effects of feeding licury (*Syagrus*

- coronate) cake to growing goats. *Asian-Australian Journal Animal Science* 23:1436-1444.
- Borzani, W., Lima, U. A., Aquarone, E., Schmidell, W. 2001. Processos Fermentativos e Enzimáticos - Biotecnologia industrial, 1ª edição. *Editores Edgard Blucher* 3: 377-378.
- Burkert, T.F., Maugeri, F. and Rodrigues, M. I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. *Bioresource Technology*. 910: 77-84.
- Cai, Y; Wang, L.; Liao, X.; Ding; Y; Sun, J. 2009. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. *Process Biochemistry* 44: 786–790.
- Carvalho, P. O., Campos, P. R. B., Noffs, M. D., Oliveira, J. G., Shimizu, M. T., Silva, D. M. 2003. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*. 26:75-80.
- Castilho, L. R., Polato, C.M.S, Barúque, E.A., Sant’Anna Jr., G.L., Freire, D.M.G. 2000. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal* 4: 239-247.
- Castro, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 27:146-156.
- Chen, B., Hu, J., Miller, E. M., Xie, W., Cai, M., Gross, R. A. 2008. *Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis. *Biomacromolecules*. 9: 463–471.
- Chowdhary, A., Ahmad, S., Khan, Z.U. 2004. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. *Indian Journal Medicine Microbiology* 22:16-22.
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., Iríde, A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*. 23: 60–67.
- Colen, G., Junqueira, R. G., Moraes-Santos, T. 2006. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J. Microb. Biotech* 22:881–885.
- Contesini, F. J., Silva, V. C. F., Maciel, R. F., Lima, R. J., Barros, F. F. C., Carvalho, P. O. 2009. Response surface analysis for the production of an enantioselective lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *The Journal of Microbiology* 47:563-571.
- Cordeiro, E.F. 1997. Efeito das condições de cultivo na composição de ácidos Graxos produzidos pelas leveduras *Candida fabianii* e *Trichosporon brassicae*, dissertação de Mestrado Faculdade de Engenharia de alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 122p.

- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D. 2006. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108: 130 – 135.
- Crepaldi, I. C., Almeida-Muradian, L. B., Rios, M. D. G., Penteado, M. V., Salatino, A. 2001. Composição nutricional do fruto de licuri (*syagrus coronata* (martius) beccari). *Revista Brasileira de Botânica* 24:155-159.
- Crueger, W., Crueger, A. 1993. Biotechnology: Industrial Microbiology Manual, S.A. Acirbia (Ed.), Zaragoza, Spain.
- Dalmau, E., Montesinosa, J. L., Lottib, M., Casasa, C. 2000. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 657–663.
- Dharmsthiti, S., Ammaranond, P. 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast *Trichosporon asteroides*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 26:111-116.
- Diaz, J. C. M., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F., Baratti, J. 2006. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme and Microbial Technology* 39:1042-1050.
- Dimitrijevic', A., Velickovic', D., Bihelovic', F., Bezbradica, D., Jankov, R., Milosavic', N. 2012. One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. *Bioresource Technology* 107: 358–362.
- Elibol, M., Ozer, D. 2002. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry* 38: 367-372.
- Fagundes, A.A.P.J., Carvalho, R.T., Focaccia R., Fernandez J.G., Araújo H.B.N., Strabelli T.M.V., Kopel L., Lage S.G. 2008. *Trichosporon asahii* an emerging etiologic agent of fungal infection and colonization in heart failure patients in intensive care unit. Case report and literature review. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 20:106-109.
- Fanan, S., Medina, P. F., Camargo, M. B. P., Ramos, N. P. 2009. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. *Revista Brasileira de Sementes* 31:150-159.
- Faria, L. A. 2010. Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de *Colletotrichum gloesporioides* produzida por fermentação em substrato líquido. dissertação Mestrado, Faculdade de Farmácia (UFMG).
- Ferreira, M. G. C., Maruyama, W. I., Soratto, R. P. 2009. Avaliação de cultivares de mamona em dois arranjos de plantas no outono-inverno em Cassilândia-MS. *Revista Brasileira óleo e Fibrosos* 13:53-60.

- Foresti, M. L., Ferreira, M. L. 2010. Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent médium: Analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses. *Enzyme and Microbial Technology* 46:419-429.
- Freitas, L., Bueno, T., Perez, V. H., Santos, J. C., Castro, H. F. 2007. Enzymatic hydrolysis of soybean oil using lipase from different sources to yield concentrated of polyunsaturated fatty acids. *World Journal Microbiology Biotechnology* 23:1725–1731
- Gandhi, N. N. 1997. Applications of Lipase. *Journal of the american oil chemists society* 74:1-14.
- Ghasemi, M., Farabakhsh, A., Farabakhsh, A. Safari, A.A. 2014. Using submerge fermentation method to production of extracellular lipase by *Aspergillus niger*. *International Journal of Biological*. 8(9)1-9
- Godfrey, T.; West, S. 1996. *Industrial enzymology*, 2nd ed. Macmillan Publishers Inc, New York, N.Y. 73pp.
- Gonçalves, F.A.G. 2007. Produção de lipases extracelular por leveduras em cultivo submerso. Dissertação de Mestrado da Faculdade de Farmácia da UFMG, 67pp.
- Hosseinpoura, M. N., Najafpoura, G. D., Younesib, H., Khorramia, M., Vaseghia Z. 2012. Lipase production in solid state fermentation using *Aspergillus niger*: response surface methodology. *International Journal of Engineering* 25: 151-159.
- Hughes, S. R., Moser, B. R., Harmsen, A. J., Bischoff, K. M., Jones, M. A., Pinkelman, R., Bang, S. S., Tasaki, K., Doll, K. M., Qureshi, N., Saha, B. C., Liu, S., Jackson, J. S., Robinson, S. Cotta, M. C., Rich, J. O., Caimi, P. 2011. Production of *Candida antarctica* lipase B gene open reading frame using automated PCR gene assembly protocol on robotic workcell and expression in an ethanologenic yeast for use as resin-bound biocatalyst in biodiesel production. *Journal of the Association for Laboratory Automation* 16: 38.
- Hughes, S. R., Moser, B. R., Robinson, S., Coxa, E. J., Harmsen, A. J., Friesenc, Jon A Bischoff, K. M., Jones, M. A., Pinkelman, R., Bang, S. S., Tasaki, K., Doll, K. M., Qureshi, N., Liu, S., Saha, B. C., Jackson, J. S., Cotta, M. C., Rich, J. O., Caimi, P. 2012. Synthetic resin-bound truncated *Candida antarctica* lipase B for production of fatty acid alkyl esters by transesterification of corn and soybean oils with ethanol or butanol. *Journal of Biotechnology* 159: 69– 77.
- Idris, A., Bukhari, A. 2012. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances* 30:550–563.
- Jaeger, K. E., Eggert, T. 2002. Lipases for Biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 390-402.
- Jaeger, K., Reetz, M.T. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology.

Trends in Biotechnology 16:396-403.

- Jeganathan, J.; Bassi, A.; Nakhla, G. 2006. Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *Journal of Hazardous Materials* 137:121-128.
- Junior, G. B., Guerra, H. O. C., Cavalcanti, M. L. F., Lacerda, R. D. 2008. Consumo de água e eficiência do uso para duas cultivares de mamonas submetidas a estresse hídrico. *Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*.12: 350–355.
- Junior, I. I., Floresa, M. C., Sutili, F. K., Leite, S. G. F., Miranda, L. S. M., Leal, I. C. R., Souza, R. O. M. A. 2012. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 77:53–58.
- Juntachai, W., Oura, T., Kajiwara, S. 2011. Purification and characterization of a secretory lipolytic enzyme, MgLIP2, from *Malassezia globosa*. *Microbiology* 157, 3492–3499.
- Kar, T., Destain, J., Thonart, P., Delvigne, F. 2012. Physical and physiological impacts of different foam control strategies during a process involving hydrophobic substrate for the lipase production by *Yarrowia lipolytica*. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35:483–492.
- Khayati, G., Alizadeh, S. 2013. Extraction of lipase from *Rhodotorula glutinis* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. *Fluid Phase Equilibria*. 353:132– 134.
- Kirsop, B. E.; Kurtzman, C. P. 1988. *Yeast*. Cambridge University Press, Cambridge. 233 pp.
- Koblitz, M. G. B., Pastore, G. M. 2006. Purification and biochemical characterization of an Extracellular lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp. *Ciências Agrotécnica* 30: 494-502.
- Kurtzman CP & Fell JW The yeast, A Taxonomic Study.4 ed Amsterdam; Elsevier Science Publishers, p. 1055. 1998
- Kohno, M., Enatsu, M., Yoshiizumi, M., Kugimiya, W. 1999. High-level expression of *Rhizopus niveus* lipase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and structural properties of the expressed enzyme. *Protein Expression and Purification* 15:327-235.
- Kong, W. B., Hua, S. F., Cao, H., Muc, Y. W., Yang, H., Song, H., Xia, C. G. 2012. Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43:360–367.
- Kontkanen, H.; Tenkanen, M.; Fagerstrom, R.; Reinikainen, T. 2004. Characterisation of

- steryl esterases activities in commercial lipase preparations. *Journal of Biotechnology*.108:51-59.
- Kumar, A., Gupta, R. 2012. Purification and biochemical characterization of a novel magnesium dependent lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54 and its application in biodiesel production. *Asian Journal of Biotechnology* 4:70-82.
- Kumar, S. S., Kumar, L., Sahai, V., Gupta, R. 2009. A thiol-activated lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: detergent compatibility and presoak formulation for oil removal from soiled cloth at ambient temperature. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 36:427-432.
- Kwon, H., Haruki, M., Morikawa, M., Omori, K., Kanaya, S. 2002. Role of Repetitive Nine-Residue Sequence Motifs in Secretion, Enzymatic Activity, and Protein Conformation of a Family I.3 Lipase. *Journal of bioscience and bioengineering* 93: 157-164.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vacarri, E.M., Melo, N.K. 2002. Tratado de Micologia Médica. 9º Ed. São Paulo: Editora Savier.
- Leal, M.C.M.R., Cammarota, M.C., Freire, D.M.G., Sant'anna JR., G.L. 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19 (2):175-180.
- Leão, M. A., Tinô, S. R. L., Fontes, R. S., Aquino. E. M. F. 2011. Materials Research.; Bending in Laminas of NFPR: Type of Reinforcement, Fracture and Properties. 14: 67-72.
- Lima, L. S., Oliveira, R. L., Bagaldo, A. R., Neto, A. F. G., Ribeiro, C. V. D. M., Lanna, D. P. D. 2011. Composition and fatty acid profile of milk from cows on pasture subjected to licuri oil supplement. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40: 2858-2865.
- Lima, R. L. S., Severino, L. S., Ferreira, G. B., Sofiatti, V., Sampaio, L. R., Beltrão, N. E. M. 2011. Casca de mamona associada a quatro fontes de matéria orgânica para a produção de mudas de pinhão-mansão. *Revista Ceres* 58:232-237.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (Eds). 2001. Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blucher 3: 593pp. (Coleção biotecnologia v.4).
- Liu, W., Zhu, W., Lu, Y., Kong, J., Ma, G. 1999. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SI409. *Process Biochemistry* 33: 331-336.
- Macrae, A. R., Hammond, R. C. 1985. Present and Future Applications of Lipases. *Biotechnology Genetics and Engineering Review* 193.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2004. Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

- Maria, P. D., Carboni-Oerlemans, C., Tuin, B., Bargeman, G., Meer, A., Gemert, R. 2005. Review Biotechnological applications of *Candida Antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 37:36–46.
- Marini, A., Imelio, N., Pico, G., Romanini, D., Farruggia, B. 2011. Isolation of a *Aspergillus niger* lipase from a solid culture medium with aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B* 879:2135– 2141.
- Martins, T.S. 2001. Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Martins, V. G., Kalil, S. J., Costa, J. A. Vieira. 2008. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. *Química Nova*. 31: 1942-1947.
- Mendes, A.A., Castro, H.F., Pereira, E.B., Júnior, A.F. 2005. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. *Química Nova*. 28(2):296-305.
- Mendes, R. C., Dias, D. C. F. S., Pereira, M. D., Berger, P. G. 2009. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). *Revista Brasileira de Sementes*. 31:187-194.
- Messias, J. M., Costa, B. Z., Lima, V. M. G., Giese, E. C., Dekker, R. F. H., Barbosa A. M. 2011. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas* 32:213-234.
- Mhetras, N., Bastawde, K., Gokhale, D. 2009. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource technology*. 100:1486-1490.
- Moraes, R. 2008. Aceitação dos insumos naturais obtidos no Brasil é maior no exterior. *Revista Química e Derivados* 13-17.
- Moriana, A., Villalobos, F. J., Fereres, E. 2002. Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. *Plant, Cell and Environment* 25:395–405.
- Nandini, K.E, Rastogi, N.K. 2011. Liquid–Liquid Extraction of Lipase Using Aqueous Two-Phase System. *Food Bioprocess Technology*. 4:295–303.
- Neto, M. S., Araújo, A. E., Beltrão, N. E. M. 2001, Zoneamento agroecológico e época de semeadura para a mamoneira na Região Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Agrometeorologia* 9:551-556.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., Guille, M., Valero, F., Ferreira-Dias, S. 2012. Optimized Production of MLM Triacylglycerols Catalyzed by Immobilized Heterologous *Rhizopus oryzae* Lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1-9.

- Oliveira, J. P. B., Lopes, J. C., Alexandre, R. S., Jasper, A. P. S., Santos, L. N. S., Oliveira, L. B. 2009. Efeito do lodo de esgoto no desenvolvimento inicial de duas cultivares de mamona em dois tipos de solos. *Engenharia Ambiental*. 6:174-180.
- Ooia, C.W., Hii, S.L., Kamala, S.M.M., Ariff, A., Linga, T.C. 2011. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochemistry*. 46:68–73 .
- Padilha, G.S., Ferreira, J.F., Castiglioni, G.L., Alegre, R.M., Tambourgi, E.B. 2011. Evaluation of an extracellular lipase from *Pseudomonas cepacia* for purification in aqueous two-phase system. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 31(1): 16-22.
- Padilha, G.S., Santana, J.C.C., Alegre, R.M., Tambourgi, E.B. 2012. Extraction of Lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and Its Biochemical Characterization. *Brazilian archives of biology and technology*. 55(1): 7-19.
- Padilha, M. E. S., Augusto-Ruiz, W. 2007. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. *Ciências e Tecnologia de Alimentos* 27:285-290.
- Palekar, A. A., Vasudivan, P. T., Yan, S. 2000. Purification of lipases: a Review. *Biocatalysis and Biotransformation* 18 (3): 177- 200.
- Panda, T. Gowrishankar, B. S. 2005. Production and applications of esterases. *Appl Microbiology and Biotechnology* 67:160-169.
- Panday, A., Soccol, C.R., Mitchellm D. 2000. New developments in solid state fermentation: I bioprocess and products. *Process Biochemistry* 35:1153-1169.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, U. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and applied biochemistry* 29:119–131.
- Pandey, K. D., Shukla, S. P., Shukla, P. N. 2004. Cyanobacteria in Antarctica: Ecology, physiology and cold adaptation. *Cellular and Molecular Biology* 50:575–584.
- Patel, R. N. 2002. Microbial enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology* 3.1:804-826
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J. A. 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* 12: 1153-1162.
- Peters, I. I. & Nelson F. E. 1951. vitamin requirements for lipase production by *Candida lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 61: 591–593.
- Pimentel, M. R. C.; Antonini, Y; Martins, R. P.; Lachance, M. A.; Rosa, C. A. 2005. *Candida riidocensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic Rain Forest of

Brazil. FEMS Yeast Research, Grã-Bretanha, 5:875-879.

- Pinheiro, T.L.F. 2006. Produção de lipases por fermentação em estado solido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.
- Pizarro, A. V. L., Park, E. Y. 2003. Lipase catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. *Process Biochemistry* 38:1077-1082.
- Poroske, L. H. 1984. Industrial-Scale Application of Enzymes to the Fats and Oil Industry. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 61: 1758-1765.
- Porto, T.S., Medeiros e Silva, G.M., Porto, C.S., Cavalcanti, M.T.H, Neto, B.B., Lima-Filho, J.L., Converti, A., Porto, A.L.F., Pessoa Jr A. 2008. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*. 47:716–721.
- Reda, S. Y., Carneiro, P. B. 2007. Oleos e gorduras: aplicações e implicações. *Revista Analytica* 123-132.
- Reguly, J.C. 1996. Biotecnologia dos processos fermentativos. Vol. 1. Editora e Gráfica Universitária-UFPEL. Pelotas/RS.
- Reguly, J.C. 2000. Biotecnologia dos processos fermentativos. Vol. 3. Editora e Gráfica Universitária-UFPEL. Pelotas/RS.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M.E., Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 147:237–250.
- Reis, RLS., Leão NSR., Souza AF., Silva GKB., Luna MAC., Silva CAA., Okada K. 2015. Evaluation of biotechnological potential of *aspergillus parasiticus* ucp 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production. *E-xacta*. 8(1) 31-42.
- Ribeiro, B. D., Castro, A. M., Zarur, M. A., Freire, D. M. G. 2011. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. *Enzyme Research* 1-16
- Rigo, E., Ninow, J. L., Di Luccio, M., Oliveira, J. V., Polloni, A. E., Remonato, D., Arbter, F., Vardanega, R., De Oliveira, D. and Treichel, H. 2010. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements", *LWT-Food Science and Technology*. 43:1132-1137.
- Rodrigues, I. A., Alviano, D. S., Gomes, M. T., Silva, D. O., Antoniassi, R., Silva, Antonio, J. R., Bizzo, H. R., Alviano, C. S., Vermelho, A. B., Rosa, M. S. S. 2011. *In vitro* anti-*Leishmania amazonensis* activity of the polymeric procyanidin-rich aqueous extract from *Syagrus coronata*. *Journal of Medicinal Plants Research* 5:3781-3790.

- Rodrigues, R. C., Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64: 1-22.
- Romero, C. M., Pera, L. M., Olivaro, C., Vazquez, A., Baigori, M. 2012. Tailoring chain length selectivity of a solvent-tolerant lipase activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation. *Fuel Processing Technology* 98:23–29.
- Saad, M. M., Kansoh, A. L., Gadallah, M. A. 2005. Optimization of extracellular lipase production by *Fusarium oxysporum*. *Arabic Journal Biotechnology* 8:19-28.
- Salah, R. B., Ghamghui, H., Miled, N., Mejdoub, H., Gargouri, Y. 2007. Production of Butyl Acetate Ester by Lipase from Novel Strain of *Rhizopus oryzae*. *Journal of bioscience and bioengineering* 103:368–372.
- Santos, J. A., Amaral, M. C. O., Araújo, T. A. S., Fernandes, K. G. C., Chaves, A. C., Morais, M. M. 2007. Isolation of a lipase-producing *Trichosporon* spp and enzyme extraction by Two-phase aqueous system. *Brazilian Journal of Microbiology* 38:62-64
- Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., Davidson, S. W. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods* 52: 1-18.
- Sharma, R, Chisti, Y., Banerjee, U. C. 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances* 19: 627-643.
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K. 2002. Production of extracellular alkaline lipase from a *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian Journal of Microbiology* 42:49–54.
- Show, P.L., Tan, C.P., Anuar, M.S., Ariff, A., Yusof, Y.A., Chen, S.K., Ling, T.C. 2011. Direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* in recycling aqueous two-phase flotation. *Separation and Purification Technology*. 80:577–584.
- Silva, T. R. B., Leite, V. E., Silva, A. R. B., Viana, L. H. 2007. Adubação nitrogenada em cobertura na cultura da mamona em plantio direto. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42:1357-1359.
- Silva, T.M.; Oliveira, R.L.; Barbosa, L.P. 2011. Preliminary study on meat quality of goats fed levels of licury oil in the diet. *Asian-Australian Journal Animal Science*. 24:1112-1119.
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166:486–520.
- Sorour, N., Karboune, S., Saint-Louis, R., Kermasha, S. 2012. Lipase-catalyzed synthesis of structured phenolic lipids in solvent-free system using flaxseed oil and selected phenolic acids as substrates. *Journal of Biotechnology* 158:128– 136.

Souza, Odacy C. – Produção de lípases por culturas de *Trichosporon*...

Souza, N. C., Mota, S. B., Bezerra, F. M. L., Aquino, B. F., Santos, A. B. 2010. Produtividade da mamona irrigada com esgoto doméstico tratado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 14:478–484.

Talukder, M. M. R., Wu, J. C., Fen, N. M., Melissa, Y. L. S. 2010. Two-step lipase catalysis for production of biodiesel. *Biochemical Engineering J.* 49:207-212.

Tan, T., Zangh, M., Wang, B., Ying, C., Deng, L. 2004. Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. *Process Biochemical* 39:459-465.

Thebaldi, M.S., Sandri, D., Felisberto, A.B., Rocha, M.S., Neto, S.A. 2011. Qualidade da água de um córrego sob influência de efluente tratado de abate bovino. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*.15(3):302–309.

Tornai-Lehocski, J., Péter, G., Dlačny, D. 2003. CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *International Journal of Food Microbiology* 86:189-200.

Treva, M.D.T., Boffey, S., Goulding, K.H., Stanbury, P. 1990. Biotecnologia: Principios biotecnológicos. Editorial Acribia, S.A. Saragoza – España, 284p.

Trodler, P., Pleiss, J. 2008. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BioMedCentral Structural Biology* 8:9.

Virto, M., Chavarri, F., Bustamante, M. A., Barron, L. J. R., Aramburu, M., Vicente, M. S., Perez-Elortondo, F. J., Albisiu, M., De Renobales, M. 2003. Lamb rennet paste in ovine cheese manufacture. *International Dairy Journal* 13: 391-399.

www.amano-enzyme.co.jp, acesso em 15/03/2013

www.embrapa.br, acesso em 08/03/2013

www.fisioterapiaquintana.blogspot.com, acesso em 20/03/2013

www.agricultura.al.gov.br, acesso em 20/03/2013

www.coopes.org.br, acesso em 15/03/2013

Xu, L., Pan, X. X., Liu, W. S., Shen, X. G., Wang, X. F., Liu, Y., Yan, Y. J. 2012. Preparation of a promising whole cell biocatalyst of *Geotrichum* sp. lipase and its properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87: 498–504.

Xu, X. 2000. Production of Specific-Structured Triacylglycerols by Lipase-Catalyzed Reactions: a Review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 3: 287-302.

Yan Q., Hao S., Jiang Z., Zhai Q., Chen W. 2008. Properties of a lipase from *Streptomyces matensis* being suitable for production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58:72-77.

- Yazawa, H., Kumagai, H., Uemura, H. 2012. Characterization of triglyceride lipase genes of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Applied genetics and molecular biotechnology* 1-11.
- Zhang, Y., Liu, J. 2010. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, 878:909–912.
- Zuchi, J., Bevilaqua, G. A. P., Sediya, C. S., Zanuncio, J. C. 2010. Variações na qualidade e tamanho de sementes de mamona pela época de semeadura e ordem floral. *Revista Ciência Agronômica* 41:403-408.

ARTIGO

ALTOS NÍVEIS DE LIPASES PRODUZIDOS POR *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 SOB FERMENTAÇÃO SUBMERSA, UTILIZANDO SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO

Odacy Camilo de Souza¹, Cyndy Mary Farias¹, Minelli Albuquerque Sousa¹, Roberta Cruz¹, Marília Maciel¹, Vanilla Mergulhão Alves da Silva¹, Érika Valente de Medeiros², Keila Aparecida Moreira², Cristina Maria de Souza-Motta¹ *.

¹Mycology Department, CCB, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Nelson Chaves, s/n, 50670-420, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil. Email: odacycamilo@yahoo.com.br; cyndy_mary@yahoo.com.br; minellisousa@yahoo.com.br; robertacruzufpe@gmail.com.br; vanillamergulhao2@gmail.com; evmbio@gmail.com; moreirakeila@hotmail.com; smotta@ufpe.br.

²Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Bom Pastor, s/n, 55292-270, Mundaú, Garanhuns, Pernambuco, Brazil. Email: evmbio@gmail.com; moreirakeila@hotmail.com

*Corresponding author: Cristina Maria de Souza-Motta. Micoteca URM (Mycology Department, CCB, Federal University of Pernambuco), Av. Professor Nelson Chaves, s/n, 50670-420, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

Tel.: +55 81 2126 8948; Fax: +55 81 2126 8480; Email: smotta@ufpe.br.

RESUMO

O potencial biotecnológico de enzimas lipolíticas produzidas por micro-organismos, tem atraído atenção devido as várias aplicações em escala industrial como na produção de alimentos, detergentes, cosméticos e fármacos. As lipases constituem um grupo heterogêneo de enzimas que catalisam a degradação de ácidos graxos. A grande demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características, tem estimulado a busca de novas cepas de micro-organismos lipolíticos, principalmente de fungos, ou a procura de novas fontes de carbono com o interesse em otimizar a produção de lipases. Espécies de *Trichosporon* vem sendo objeto de estudos devido a sua capacidade de produzir lipases extracelulares. O objetivo deste trabalho foi identificar as variáveis que influenciam a produção lipolítica *T. sporotrichoides* URM6630 através do designer experimental Plakett-Burman (PB) e Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O estudo de produção foi conduzido 11 variáveis e posteriormente identificadas três componentes importantes que influenciaram a produção de lipases: temperatura, concentração de KH_2PO_4 e concentração de óleo de licuri. Os valores ótimos dessas três variáveis foram determinados utilizando MSR. A interação entre licuri e concentração de KH_2PO_4 apresentaram um melhor resultado obtendo produção máxima de lipase de 104,07 U/mL. *Trichosporon sporotrichoides* URM6630 é indicado como micro-organismo promissor para produção de lipases.

Palavras-chave: *Trichosporon*, atividade lipásica, óleo de licuri, caracterização lipásica

1. Introdução

Lipases (E.C.3.1.1.3) são enzimas encontradas na natureza, a partir de tecidos animais, vegetais e em micro-organismos. Atuam sobre as ligações ésteres presentes em triacilglicéreis, liberando diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e glicerol, constituem uma classe especial de esterases por agir na interface entre a fase aquosa e não-aquosa o que as distingue das esterases, que são enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lipídeos (Darvishi et al., 2009; Barros et al., 2010; Hama et al., 2010; Rigo et al., 2010).

Sob certas condições, as lipases também catalisam reações de esterificações, transesterificações e interesterificação em solventes orgânicos, onde o teor de água influencia a posição de equilíbrio das reações. As aplicações referem-se em geral à separação de gorduras, síntese de ésteres de alto valor agregado, produção de substitutos da manteiga de cacau, resolução de misturas racêmicas e como aditivos na indústria farmacêutica, têxtil, química e alimentícia (Barros et al., 2010; Sun et al., 2012; Santos et al., 2014).

As lipases vêm conquistando uma faixa crescente do mercado de enzimas industriais, pois são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos para modificação do sabor (Barros et al., 2010; Najjar et al., 2011), farmacêutica para digestão de óleos e gorduras nos alimentos (Rigo et al., 2010), detergentes para hidrólise de gorduras, tratamento residuais para remoção de substâncias oleosas (Sing and Satyanarayana, 2008; Demir and Tukul, 2010; Kong et al., 2012). Devido à sua versatilidade, o uso de lipases como biocatalisadores tem um enorme potencial para reduzir os requisitos de energia e os problemas ambientais em diversos setores (Pereira et al., 2013; Reis et al., 2015). Em medicina as lipases são utilizadas para determinação quantitativa de triglicerídeos no sangue (Sing and Satyanarayana, 2008), e no setor de combustíveis para síntese de ésteres e

transesterificação catalisada por lipase é considerada como uma das técnicas mais promissoras para a produção de biodiesel (Bautista-Gallego et al., 2011 Zhao et al., 2015).

Alguns micro-organismos produzem uma quantidade reduzida de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Dentre os fungos, os filamentosos, tais como *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* são os mais utilizados para a produção industrial enzimas extracelulares porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e modificando-se as condições operacionais é possível, com a otimização do processo de produção potencializar a obtenção de enzimas, aumentando significativamente o rendimento enzimático (Pizarro et al., 2012; Pereira et al., 2013).

As leveduras são fungos predominantemente unicelulares, aclorofilados têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais. As leveduras são muito versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais (Araujo and Hagler, 2010; Huang et al., 2010). Espécies do gênero *Trichosporon* são leveduras cujo uso em processos biotecnológicos para produção de diversas enzimas, tem crescido extensivamente. Algumas espécies são citadas como produtoras de celulasas, proteases, xilanases e lipases. Entretanto seu potencial biotecnológico é pouco explorado quando comparado a outras leveduras (Liu et al., 1999; Silva-Neves et al., 2006; Ribeiro et al., 2011).

A demanda industrial por novas fontes de lipases com diferentes características tem estimulado a procura de novos micro-organismos lipolíticos, principalmente por leveduras, ou a procura de novas fontes de carbono com o interesse em otimizar a produção de lipases. Os óleos vegetais são considerados excelentes fontes de energia por conter, predominantemente em sua composição, ácidos graxos sendo considerados como bons indutores de lipases. (Colen et al., 2006; Nandini and Rastogi, 2009; Treichel et al., 2010). Não foram encontrados relatos na literatura do uso do de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari), como substrato para a produção de lipase, no

entanto devido a sua importância nutricional, torna-se uma alternativa para estudo do processo de produção destas enzimas. Aliás, o nosso grupo já obteve elevada produção de lipase utilizando como substrato o resíduo bruto de licuri e *Aspergillus candidus* URM 5611 como microrganismo produtor (Farias et al, 2015).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram selecionar culturas de *Trichosporon* isoladas do solo e preservadas sob óleo mineral depositadas na Micoteca-URM, quanto a sua viabilidade, autenticação taxonômica e caracterização lipolítica utilizando diferentes fontes de carbono como substratos, assim como, selecionar o melhor produtor e identificar as variáveis que influenciam de forma significativa a produção de lipases pela linhagem selecionada através do planejamento Plakett-Burman (PB), bem como pela Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).

2. Materiais e Métodos

2.1. Micro-organismo

Foram utilizadas 53 culturas de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral no período de 1955 a 2011 na Coleção de Culturas Micoteca URM (WDCM604) mantido em tubos de ensaios contendo o meio de cultivo ágar Saboraud, acrescido 5% de extrato de levedura a 28 °C.

2.2. Reativação e autenticação taxonômica das culturas

A reativação foi realizada através da retirada de fragmentos das culturas preservadas sob óleo mineral, transferidos com auxílio de uma alça de platina para caldo glicosado e mantidos a 28°C ± 2°C. Após crescimento, as culturas foram transferidas para o meio agar saboraud acrescido de extrato de levedura (YES) mantidos a 28°C ± 2°C para verificar a viabilidade, pureza e autenticação taxonômica, através das características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas segundo Domsch e Gams (1993), Barnett et al. (2000) e de Hoog et al. (2000).

2.3. Screening em meio sólido dos produtores de lipase

Para determinação da capacidade lipolítica, foram retirados fragmentos das culturas mantidas em SYE contidos em tubo de ensaio e transferidos para o centro da placa de Petri contendo o referido meio. Após sete dias de crescimento, fragmentos da cultura foram transferidos para tubos contendo o meio agar-água, posteriormente pipetado para o centro da placa de Petri com meio de cultura, contendo 10g peptona, 5g cloreto de sódio, 2g cloreto de cálcio, 20g ágar e 10 ml Tween 20, ajustado o pH para 7,4, para 1000 mL de água destilada. Proposto por Sierra (1957) em triplicata. As culturas foram incubadas em BOD (Biochemical Oxygen Demand) (TECNAL TE424) a 28°C e 37°C $\pm$ 2°C, observadas durante 24, 48, 72 e 96 horas, evidenciando-se um halo claro em torno das colônias indicativo de atividade lipolítica. O Índice Enzimático (IE) foi expresso pela média aritmética da relação entre o diâmetro do halo e o diâmetro do crescimento da colônia segundo Hankin e Anagnostakis (1975).

2.4. Screening em meio líquido dos produtores de lipase

O experimento foi realizado em duplicata utilizando Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios I composto por 1% (v/v) de óleo de oliva adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, meio II contendo 1% (v/v) de óleo de mamona adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, e meio III composto por 1% (v/v) de óleo de licuri adicionado de 0,5% (p/v) extrato de levedura, todos com o pH ajustado para 6.5. Esterilizados a 120°C durante 15 minutos, resfriados e inoculados com disco de 5 mm obtidos a partir da colônia central de todos os micro-organismos e incubados em agitador orbital (TECNAL TE424) a 160 rpm a 37°C por 96 horas.

2.5. Atividade lipolítica

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinar a atividade da lipase de acordo com Pimentel et al. (1994), com base na hidrólise de p-nitrofenilpalmitato (pNPP) em p-nitrofenol

(pNPP) e palmitato. A atividade consiste na mistura de 1 mL de extrato enzimático bruto e 9 mL da solução substrato (0,018 g p-nitrofenilpalmitato (pNPP) dissolvido em 6 mL de isopropanol, em 450 mL em solução tampão fosfato 50 mM pH 8.0 contendo 2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica). A libertação de pNP a 37 °C, em 30 minutos de incubação, foi detectada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a clivagem de 1 $\mu\text{mol/min}$ pNPP, pH 8,0 (0,05 M em solução tampão fosfato), 37 °C. O coeficiente de extinção molar de pNPP ($1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática.

2.6. Otimização do meio de produção de lipase

2.6.1. Meio de fermentação

O meio de produção de lipases foi preparado utilizando óleo de licuri (1%) como meio basal, que continha diferentes concentrações de nutrientes testados de acordo com designer experimental Plackett-Burman (PB). O meio de cultivo teve o pH inicial do meio de cultivo ajustado de acordo com o planejamento e esterilizado a 121 °C durante 15 min. Discos do inóculo foram adicionados a cada 50 mL de meio em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL de acordo com a matriz. Os frascos foram incubados por cinco dias em diferentes temperaturas, sob agitação orbital em diferentes rotações.

2.6.2. Identificação e seleção das variáveis significativas para a produção de lipase usando planejamento Plackett-Burman (PB)

Com base no design PB, cada componente foi examinado em dois níveis: "-1" para baixo e nível '+1' para cima. Foram testados 11 variáveis, utilizando o software statistc 7®, que gerou um conjunto de 12 ensaios experimentais e possibilitou a identificação estatística das variáveis mais

significativas. A Tabela 1 apresenta os componentes do meio sob análise bem como os níveis de cada uma das variáveis usadas no planejamento, enquanto a Tabela 2 representa a matriz.

Tabela 1. Variáveis e níveis utilizados no planejamento Plackette-Burman (PB)

Variáveis	Inferior (-1)	Superior (+1)
1 - Tempo de incubação (horas)	72	120
2 – pH	5	7
3 – Temperatura (°C)	28	36
4 – Rotação (rpm)	100	150
5 - Tamanho do inóculo (m/m)	5	7
6 – Óleo (% v/v)	0,5	1
7 - Extrato de levedura (% m/v)	0	0,5
8 - Cloreto de sódio (% m/v)	0,5	1
9 - Cloreto de cálcio (% m/v)	0	0,1
10 - Sulfato de amônio (% m/v)	0	0,1
11 - KH_2PO_4 (% m/v)	0	0,1

Tabela 2. Matriz estatística com total de ensaios e variáveis correspondente a cada ensaio

Ensaios	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	120	7	28	150	5	0,5	0	1	0,1	0,1	0
2	120	7	28	150	7	0,5	0,5	0,5	0	0	0,1
3	72	7	40	100	7	0,5	0	0,5	0,1	0,1	0,1
4	72	5	40	150	7	0,5	0,5	1	0	0,1	0
5	120	7	40	100	7	1	0	1	0	0	0
6	72	5	28	100	5	0,5	0	0,5	0	0	0
7	120	5	40	100	5	0,5	0,5	1	0,1	0	0,1
8	72	5	28	150	7	1	0	1	0,1	0	0,1
9	120	5	40	150	5	1	0	0,5	0	0,1	0,1
10	72	7	40	150	5	1	0,5	0,5	0,1	0	0
11	72	7	28	100	5	1	0,5	1	0	0,1	0,1
12	120	5	28	100	7	1	0,5	0,5	0,1	0,1	0

2.6.3. Metodologia de superfície de resposta (MSR)

Para otimizar a produção de lipase foi utilizada MSR avaliando as concentrações dos três fatores significativos nomeadamente temperatura, óleo de licuri e concentrações de KH_2PO_4 (Tabela 3), totalizando um conjunto de 20 ensaios experimentais, com seis pontos centrais. As variáveis independentes foram estudadas em três diferentes níveis: baixos (-1), médio (0) e alto (1).

Experimentos foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio (pH 7,0) preparado de acordo com a matriz experimental, incubados em agitador orbital a 100 rpm.

Tabela 3. Variáveis significativas utilizadas na metodologia de superfície de resposta (MSR)

Variáveis independentes	- α	-1	0	1	+ α
Temperatura (°C)	28	31	34	37	40
Óleo (% v/v)	0,5	0,625	0,75	0,875	1
KH ₂ PO ₄ (% m/v)	0	0,025	0,05	0,075	1

2.7. Caracterização parcial das lipases produzidas por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630

Para caracterização enzimática parcial utilizou-se os isolados fermentados em meio de licuri, (Meio III) pois apresentaram maior produção enzimática nas condições de cultivo, e foi avaliado o efeito do pH, temperatura, íons, solventes e detergentes.

2.7.1. Efeito ao pH e temperatura

Para determinar o pH ótimo para a atividade da lipase, o extrato bruto foi analisado na faixa de pH 3,0 - 10,0 usando os seguintes tampões (100 mM): citrato (pH 3,0 – 6,0), fosfato (pH 6,0 – 8,0), Tris-HCl (pH 8,0) e carbonato (pH 9,0 – 10,0). A temperatura ótima para atividade da enzima também foi determinada, o extrato enzimático bruto foi testado em diferentes temperaturas entre 30 e 90° C. A atividade enzimática foi realizada em triplicata, utilizando espectrofotometria (Pimentel et al. 1994).

2.7.2. Efeito a íons, detergentes e solventes orgânicos

Para avaliação dos efeitos de íons, detergente e de solventes orgânicos, o extrato bruto foi incubado com os inibidores (1:1) a 37 ° C por 30 min. Após esse período acrescentou-se o substrato e foi realizada a leitura em espectrofotômetro. A atividade enzimática residual foi expressa em porcentagem da atividade no tempo zero (100%), em triplicata (Pimentel et al. 1994; Dantas; Aquino, 2010).

3. Resultados e discussão

3.1. Viabilidade e autenticação taxonômica das culturas de *Trichosporon*

Das 53 culturas de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral, 50 permaneceram viáveis, mantendo as características típicas da espécie. Apenas três culturas estavam inviáveis, sendo: URM 573, URM 3963 e URM 4914, todas pertencentes à espécie *T. cutaneum* (Tabela 4). Desta forma o método de preservação sob óleo mineral, apresentou-se adequado para a manutenção de culturas de *Trichosporon* uma vez que tais micro-organismos se mantiveram viáveis após estocagem durante 55 anos. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os obtidos por Braz et al., (2009). Estes autores avaliaram a viabilidade de 31 isolados de *Acremonium* preservados sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM, Brasil. Do total, 26 mantiveram-se viáveis, preservando suas características morfofisiológicas. Avaliando culturas pertencentes aos gêneros *Cladosporium* e *Trichosporon* preservadas também sob óleo mineral, Silva, (2009) observaram viabilidade de até 40 anos. De acordo com Figueiredo (2001), uma ampla variedade de fungos sobrevivem nesse método, mantendo estabilidade entre 6, 7 e até mesmo 20 anos. Os resultados obtidos no presente estudo superam os já relatados pela literatura, visto que culturas de *Trichosporon* spp. com 55 anos de preservação mantiveram-se viáveis. Entretanto, para alguns gêneros de fungos este método de preservação pode não ser eficaz. Por exemplo, Bezerra et al. (2006) avaliaram 20 culturas de

Coccidioides immitis preservadas Coleção de Culturas do Instituto Oswaldo Cruz e apenas cinco delas foram viáveis.

A determinação da viabilidade fornece dados importantes da sobrevivência das células durante o procedimento de preservação e tempo de manutenção destas culturas em coleções, bem como a importância da utilização de pelo menos dois métodos de preservação das culturas em duplicata, garantindo que isolados quando sensíveis a determinado método de preservação possam ser reativados, para estudos, a partir de outro método. É importante enfatizar que a Micoteca URM mantém culturas de *Trichosporon* e os demais fungos filamentosos e leveduras em pelo menos dois métodos de preservação em duplicata.

Tabela 4. Viabilidade, avaliação qualitativa e quantitativa da produção de lipase, através de fermentação submersa, por espécies de *Trichosporon* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas Micoteca URM.

Nº URM	Espécie	Viabilidade	Avaliação Qualitativa	Atividade de lipase (U/mL)		
				Óleo de Oliva	Óleo de Mamona	Óleo de Licuri
572	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,85	18,80	21,69
573	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
695	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	10,69	25,87	23,92
1002	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	14,67	16,01	27,92
1015	<i>Trichosporon appendicularis</i> Batista & Silveira	+	+	13,63	28,11	23,68
1018	<i>Trichosporon sericeum</i> (Stautz) Diddens & Lodder	+	+	11,39	19,85	16,06
1028	<i>Trichosporon figueirae</i> Batista & Silveira	+	+	10,69	16,01	16,36
1034	<i>Trichosporon capitatum</i> Diddens & Lodder	+	+	10,69	17,26	36,02
1080	<i>Trichosporon beigelli</i> Kucker ex Raben	+	+	8,80	24,13	17,21
1099	<i>Trichosporon capitatum</i> Diddens & Lodder	+	+	12,78	20,54	21,04
1100	<i>Trichosporon fermentans</i> Diddens & Lodder	+	+	14,67	17,26	20,99
1103	<i>Trichosporon sericeum</i> (Stautz) Diddens & Lodder	+	+	25,22	24,12	15,77
1282	<i>Trichosporon lodderi</i> Phaff., Mrak & Williams	+	+	12,58	19,50	22,43

1291	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	15,52	21,04	34,42
1323	<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	+	+	10,69	22,43	30,59
1404	<i>Trichosporon infestans</i> Moses & Viana	+	+	13,78	17,41	34,72
1723	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	17,41	16,01	15,47
2235	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,85	24,67	26,81
2330	<i>Trichosporon arenicolo</i> Marques & Aciloe de Queiroz	+	+	17,76	20,69	27,86
2606	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	23,63	17,26	15,32
2872	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	11,04	17,26	19,45
3255	<i>Trichosporon fennicum</i> Sunk & Yarrow	+	+	9,15	21,39	38,35
3963	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
4250	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	12,23	24,47	14,57
4251	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	9,85	21,39	23,93
4259	<i>Trichosporon pullulans</i> (Lindner) Diddens & Lodder	+	+	11,39	25,02	38,55
4437	<i>Trichosporon beigelli</i> (Kiichenmeister & Rabenhorst) Vuillemin	+	+	7,76	25,87	33,03
4440	<i>Trichosporon aquatile</i> Hedrick & Dupont	+	+	12,93	22,93	32,98
4486	<i>Trichosporon lutetiae</i> Saëz	+	+	16,51	18,25	19,70
4488	<i>Trichosporon dulcitum</i> (Berkhout) Weijman	+	+	11,04	24,32	16,51
4789	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	12,93	21,39	15,42
4846	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	8,95	21,54	35,02
4914	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	-	+	NR	NR	NR
4973	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,45	13,08	38,16
5003	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,50	17,61	22,33
5196	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,30	18,11	25,22
5287	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	15,02	15,17	26,76
5743	<i>Trichosporon cutaneum</i> Mrak & O.B. Williams	+	+	9,30	21,54	21,19
5781	<i>Trichosporon ashaii</i> Akagi ex Sugita, A. Nishikawa & Shinoda	+	+	11,39	17,61	20,84
6076	<i>Trichosporon asteroides</i> (Rischin) M. Ota	+	+	19,50	19,85	18,11
6077	<i>Trichosporon ovoides</i> Behrend	+	+	10,84	13,08	22,38
6078	<i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	16,36	14,32	22,24

6079	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	10,84	22,43	19,30
6080	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	11,54	22,43	18,35
6248	Behrend <i>Trichosporon sporotrichoides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog	+	+	12,23	23,97	25,92
6290	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	22,93	24,12	29,89
6291	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	11,04	20,34	18,25
6292	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	9,15	22,23	24,97
6293	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	19,30	18,10	18,26
6294	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	11,74	17,61	32,78
6295	Behrend <i>Trichosporon cutaneum</i> (Beurm., Gougerot & Vaucher bis) M. Ota	+	+	6,56	13,63	23,33
6296	Behrend <i>Trichosporon ovoides</i>	+	+	10,34	17,76	16,96
6630	<i>Trichosporon sporotrichoides</i> (Oorschot) Oorschot & de Hoog	+	+	32,63	34,03	39,85

(-) : não viável; (+) : crescimento; (NR): não realizado

3.2. Avaliação qualitativa da produção de lipases por culturas de *Trichosporon*

Quanto à avaliação qualitativa da produção de lipases, todas as 50 culturas viáveis apresentaram halo ao redor da colônia, nas temperaturas de 28°C e de 37°C, indicando a capacidade de produção de lipases (Figura 1).

Roveda et al. (2010) estudou 21 isolados fungicos, pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*, observou que desses 9 fungos, espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, mostraram os melhores resultados quanto à atividade lipásica em meio sólido, utilizando azeite de oliva como fonte de carbono. Wenzel, et al. (2013) avaliou o potencial enzimático de 24 fungos endofíticos isolados de soja, *Botryotrichum* sp. *Aspergillus* sp. *Nigrospora* sp. *Bipolaris* sp. *Acrospeira* sp. *Phomopsis* sp. *Scopulariopsis* sp. *Mucor* sp. *Alternaria* sp. *Leptosphaerulina* sp. *Penicillium* sp. *Trichothecium* sp. *Papulaspora* sp. *Fusarium* sp., para a produção de lipase em meio sólido, nenhum dos isolados apresentaram atividade lipolítica.

Todas as culturas que apresentaram atividade de lipase em meio sólido foram selecionadas para avaliação quantitativa da produção de lipases, utilizando três substratos como fonte de carbono (Tabela 4).

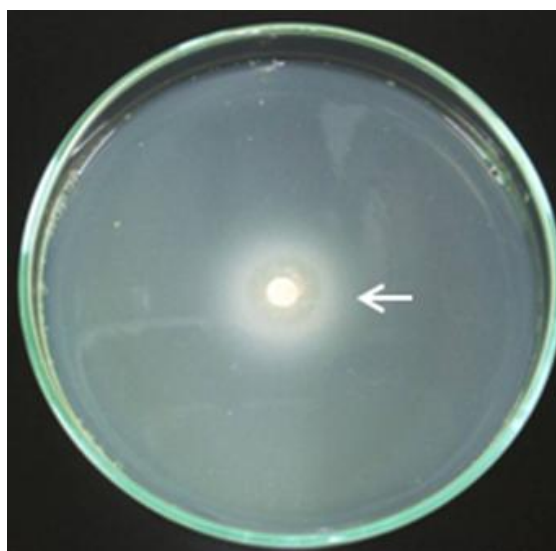


Figura 1. Halo de degradação de lipídio (Tween 20) ao redor da colônia, indicando capacidade de produção de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630.

3.3. Avaliação quantitativa da produção de lipases por culturas de *Trichosporon*

Todas as 50 culturas testadas produziram lipases através de fermentação submersa, utilizando três diferentes substratos: óleos de oliva (*Olea europaea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc.). Quando o substrato lipídico foi o óleo de oliva, as atividades variaram entre 7,76 (URM 4437) e 32,63 (URM6630) U/mL. Quando óleo de mamona foi utilizado como substrato, a máxima produção de lipase foi observada por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 com 34,03 U/mL, e a menor produção foi por *Trichosporon cutaneum* URM 4973, com 13,08 U/mL. Porém, o óleo de licuri apresentou-se como melhor indutor da produção de lipases pelas culturas testadas. A mínima atividade observada foi de 15,32 U/mL por *Trichosporon cutaneum* URM 2606. Como melhor produtor de lipases, *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 foi selecionado para estudos de otimização da produção enzimática,

utilizando óleo de licuri como substrato com a maior atividade lipolítica (39,85 U/mL) dentre todos os substratos e microorganismos testados. A capacidade da produção de lipases por leveduras, vêm sendo amplamente reconhecida pela literatura. Ciafardini et. al., (2006) testaram *Saccharomyces cerevisiae* 1525 e *Williopsis californica* 1639 para a produção de lipases e ambas as leveduras demonstraram uma boa produção desta enzima.

Coton et al. (2006) avaliaram a produção de lipases, através de 137 isolados de leveduras, utilizando óleo de oliva como substrato. Das 137 culturas, 11 produziram a enzima, com destaque para *Pichia anomala*, *Candida boidinii* e *Debaryomyces etchellsii*. No presente estudo, das 50 culturas de *Trichosporon* testadas, todas produziram lipases, sendo 39,85 U/mL a máxima atividade obtida por *Trichosporon sporotrichoides* URM6630.

Dalmau et al., (2000), avaliando a produção de lipases por *Candida rugosa*, utilizaram diferentes fontes de carbono e verificaram que os maiores rendimentos de enzima foram obtidos com lípidios e ácidos graxos como fonte de carbono. No presente estudo os autores verificaram uma baixa produção de lipase com os substratos testados. O Tween 80 estimulou a produção de lipase e secreção no exterior da célula de 0,4 U/mL e o ácido palmítico de 5,3 U/mL, bem abaixo dos resultados aqui obtidos com *T sporotrichoides* URM6630 utilizando óleo de licuri como substrato.

Avaliando 199 isolados de leveduras principalmente dos gêneros *Candida*, *Pichia* e *Saccharomyces*, Batista-Gallego et al. (2011), observaram altos níveis de β -glucosidase e esterase. De acordo com autores, para a espécie *Wickerhamomyces anomalus*, que obteve os melhores resultados, foi observada uma elevada atividade para esterase e β -glucosidase, mas moderada para a lipase.

O potencial de linhagens pertencentes ao gênero *Trichosporon* para a produção de lipases, tem sido relatada na literatura (Santos et al, 2007; Zhang & Liu, 2010). Este potencial deve-se a sua alta especificidade por acilgliceróis contendo ácidos graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição 9 (Sugihara et al., 1994). Macêdo et al. (1997) testaram a produção de lipases por

Trichosporon sp. sob fermentação submersa em meio composto por farinha de soja e trigo em pó como fontes de carbono. Os autores observaram baixos níveis de atividade total 6,22 U/mL. No presente estudo, utilizando óleo de mamona (*Ricinus communis*. L.) e sob o mesmo processo fermentativo, *T. sporotrichoides* URM 6630 mostrou-se mais promissor ao produzir 39,85 U/mL, no screening inicial. Desta forma o *T. sporotrichoides* URM 6630 foi selecionado para otimização e caracterização enzimática e para esta espécie é o primeiro relato da produção de lipases.

3.4. Otimização da produção de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630

3.4.1. Design Plackett-Burman (PB)

3.4.1.1 Análise estatística dos componentes do meio para a produção de lipases no planejamento PB

O uso de modelos estatísticos para otimizar o meio, os componentes do meio de cultura e outras condições de cultivo, aumentou na biotecnologia moderna devido à sua propensão e relevância. No presente estudo, os componentes de cultura necessários para a produção de lipases foram selecionados usando o projeto PB. Com base no design PB, cada componente foi examinado em dois níveis: "-1" para baixo e nível '+1' para cima, testados em 11 variáveis, obtendo um conjunto de 12 ensaios experimentais (ver tabela 1 e 2 na seção materiais e métodos). Os resultados de atividade para estes 12 ensaios estão apresentados na figura 2.

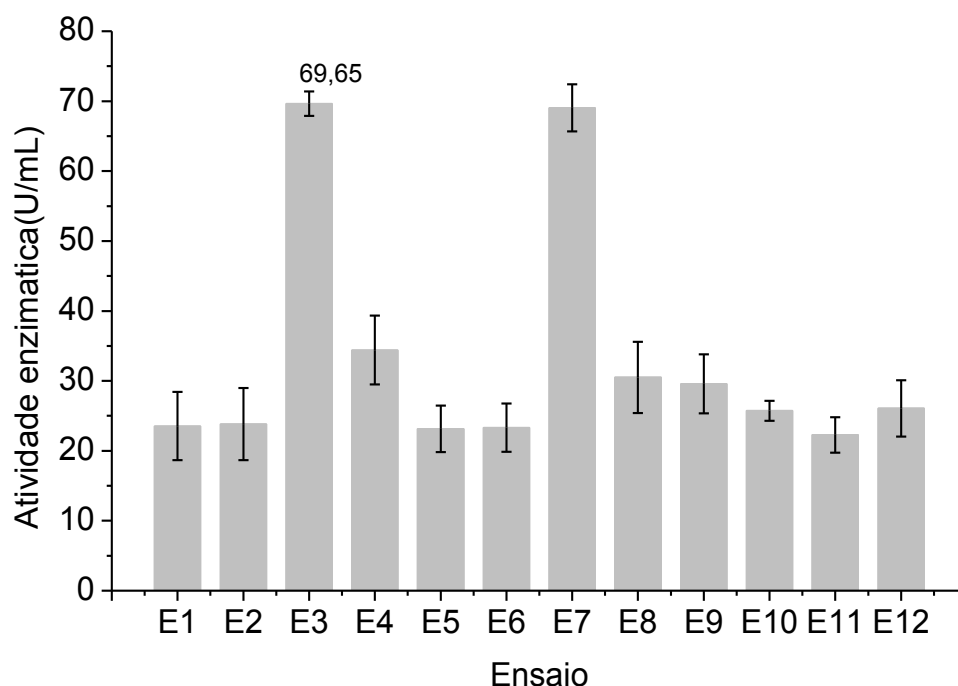


Figura 2. Gráfico de atividade enzimática para os 12 ensaios do planejamento Plackett-Burman (PB) .

Após obtenção dos resultados de atividade enzimática e utilizando o pacote de software estatístico, foi possível a identificação e seleção das variáveis mais significativas. A Figura 3 apresenta os efeitos individuais para a produção das lipases, e os dados evidenciam que das 11 variáveis utilizadas para a fermentação, as variáveis tempo de incubação, pH, tamanho do inóculo, concentração de extrato de levedura, cloreto de sódio, sulfato de amônio, não foram estatisticamente significativas para a produção das lipases. As variáveis concentração de óleo licuri e rotação influenciaram significativamente a produção enzimática de forma negativa. As variáveis temperatura, cloreto de cálcio (CaCl_2) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) influenciaram de forma positiva a produção lipolítica.

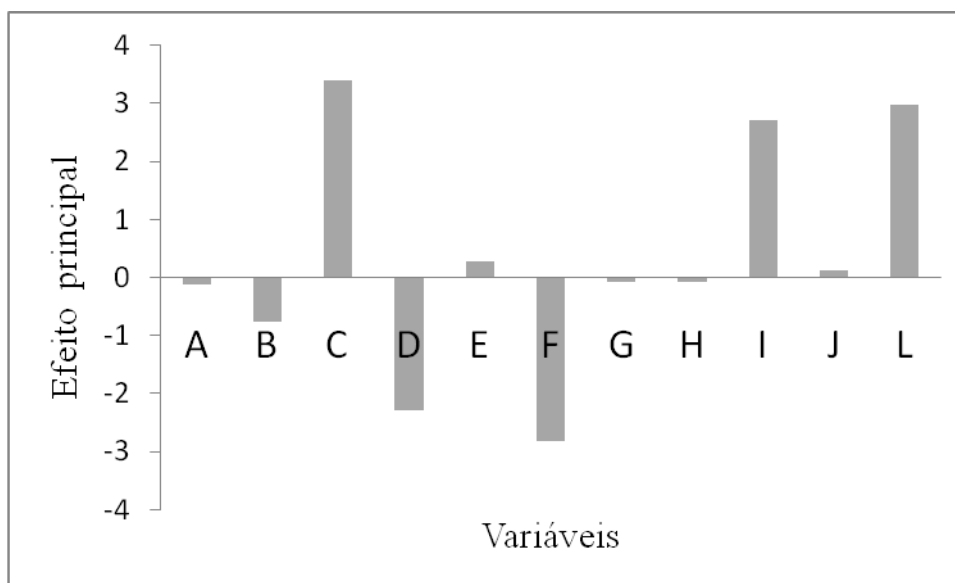


Figura 3. Gráfico dos efeitos individuais para a produção das lipases em fermentação submersa por *T. sporotrichoides* URM6630 (A, Tempo de incubação; B, pH; C, Temperatura; D, Rotação; E, Tamanho do inoculo; F, óleo; G, Extrato de levedura; H, Cloreto de sódio; I, Cloreto de cálcio; J, Sulfato de amônio; L, fosfato de potássio).

Na avaliação estatística do efeito das condições de temperatura e concentrações de óleo e de KH_2PO_4 na atividade lipolítica, através da observação do gráfico de Pareto (Figura 4) verificou-se o efeito principal ou de primeira ordem e das interações entre as variáveis (efeito de segunda ordem) sobre as variáveis respostas, em ordem de magnitude. O comprimento das barras é proporcional ao efeito padronizado da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos, pois as barras que se estendem através desta linha correspondem aos níveis de significância de 95%.

Observou-se que, os efeitos significativos das variáveis estudadas, assim como as interações entre estas, a variável temperatura (1) apresentou o maior efeito positivo (95%) sobre a atividade lipolítica, isto é, aumentando a temperatura de incubação do meio de cultivo favoreceu o aumento da atividade enzimática. A concentração do óleo de licuri apresentou efeito negativo, com nível de confiança de 95%. A relação entre a temperatura e a concentração de KH_2PO_4 , (1x3) interagiram de forma positiva. A interação entre a temperatura e a concentração de óleo de licuri, (1x2) interagiram de forma negativa e as interações das demais variáveis em estudo não foram significativas.

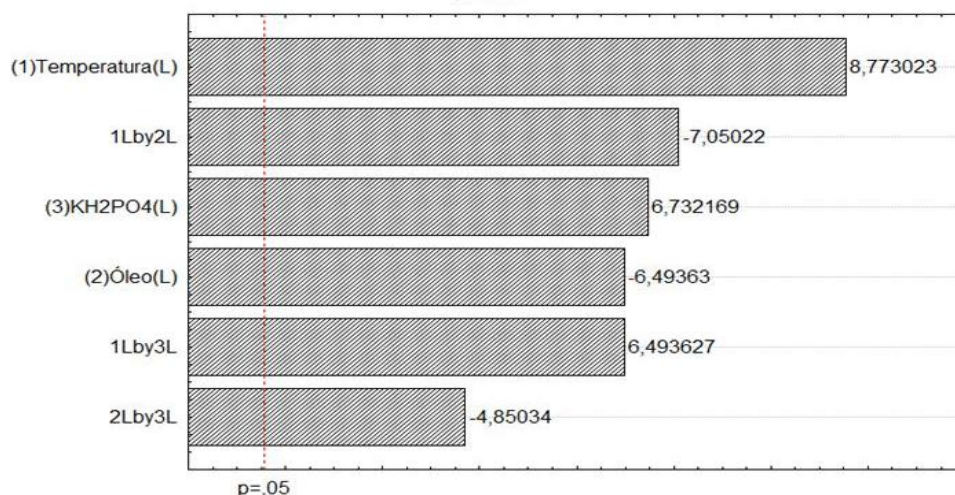


Figura 4. Gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais das variáveis para a produção das lipases baseados nos resultados experimentais Plackett-Burman (PB).

Durante todas as análises foi observado um padrão similar dos efeitos das variáveis, mesmo em tempos de fermentação diferentes. Observou-se na Figura 4 que a temperatura foi o parâmetro mais significativo para a produção de lipases por *T. sporotrichoides* URM 6630. O efeito da concentração do óleo de licuri foi significativo e negativo, ou seja, uma pequena concentração do indutor (0,5%) favoreceu a produção de lipases pelo micro-organismo em estudo. A adição do extrato de levedura ao meio não foi significativa para a produção enzimática por *T. sporotrichoides* URM 6630, sendo um nutriente de maior custo. Portanto, em caso de produção industrial, a ausência deste no meio minimizará os custos da produção.

Utilizando planejamento PB como ferramenta estatística, Gopinath et al. (2003) otimizaram a produção de lipases por *Geotrichum candidum*. Os autores observaram sete variáveis que influenciaram (tempo de incubação, pH, temperatura, galactose, sulfato de amônio, nitrato de sódio e Tween-80) a produção de lipases pela linhagem analisada.

Visando otimizar ainda mais a produção de lipases por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630, as condições aplicadas no ensaio 3 do planejamento PB foram selecionadas para serem utilizadas na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Neste ensaio, o micro-organismo produziu 69,65 U/mL de lipases.

3.4.2. Otimização das variáveis significantes usando Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é aplicada em experimentos industriais para encontrar condições ótimas para fatores de delineamento. É atualmente, o mais difundido conjunto de técnicas para otimizar, sendo composta de duas etapas: modelagem e deslocamento (Basheer et al., 2011). A MSR foi adotada através da seleção das variáveis significativas: temperatura, óleo de licuri e KH_2PO_4 . Na Tabela 5 estão descritos os valores da atividade lipásica (U/mL) obtidos no experimento da MSR, evidenciando que as melhores condições para a produção da lipase por fermentação submersa por *T. sporotrichoides* URM 6630 encontra-se no ensaio 12 composto: óleo de licuri (0,75% v/v), KH_2PO_4 (1% p/v) e incubados em 34°C. Neste ensaio a atividade de lipase experimental foi de 104,07 U/mL, resultado aproximadamente cinco vezes maior que os encontrados por Salihu et al. (2011) que trabalharam com a levedura *Candida cylindracea* utilizaram Tween-80 como fonte de carbono e obtiveram uma atividade lipásica de 20,26 U/mL após a aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta.

Basheer et al. (2011) avaliaram a produção de lipases por linhagem de *Aspergillus awamori* utilizando óleo de arroz como substrato. Os autores obtiveram máxima produção das enzimas com (2% v/v) de óleo e 0,05 de KH_2PO_4 . No presente estudo, a concentração do óleo de licuri influenciou negativamente a produção das lipases. Enquanto que o acréscimo do KH_2PO_4 no meio promoveu o aumento da atividade da enzima e sua interação com o óleo de licuri diminuíram a atividade das lipases

Pinheiro et al (2008) produziram lipases por *Penicillium verrucosum* em fermentação submersa utilizando o mesmo modelo experimental e um meio acrescido de peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5% e azeite de oliva obtiveram, após 96 horas, atividade de 3,15 U/mL. Puthli et al. (2006), que avaliaram a produção de lipases por *Candida rugosa*, obtendo-se uma atividade máxima de 1,84 U/mL após um período de 66 horas de fermentação. Santos et al, 2007

trabalhando com *Trichosporon spp* conseguiram uma produção de lipase de 7,3 U/mL após 72 horas de cultivo. Todos esses resultados estão bem abaixo dos encontrados no ensaio aqui com o *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630.

Tabela 5. Desenho experimental e resultados da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Ensaio	Temperatura	Óleo	KH ₂ PO ₄	Atividade lipolítica U/mL	
				Experimental	Esperada
1	1	1	1	74,22	88,80
2	1	1	-1	50,04	58,00
3	-1	-1	1	49,20	63,38
4	1	-1	-1	64,22	65,02
5	0	0	0	68,15	71,73
6	0	0	0	14,92	71,73
7	0	0	0	14,05	71,73
8	0	- α	0	74,22	68,00
9	0	0	- α	47,61	47,36
10	1	-1	1	69,05	84,87
11	- α	0	0	77,96	62,28
12	0	0	+α	104,07	82,18
13	0	0	0	73,72	71,73
14	0	0	0	14,57	71,73
15	-1	1	-1	55,22	61,59
16	-1	-1	-1	51,79	59,35
17	+ α	0	0	88,75	80,19
18	0	+ α	0	88,20	74,17
19	-1	1	1	55,22	76,56
20	0	0	0	73,72	71,73

Atividade enzimática $\pm$ padrão de derivação

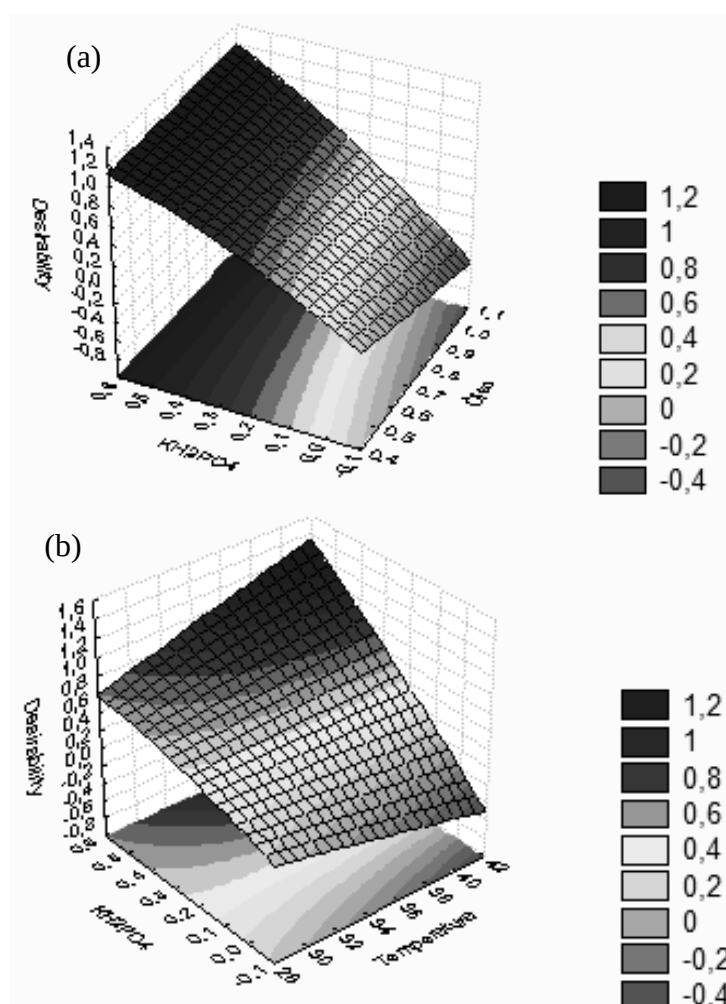
A análise de variância indicou que o modelo estabelecido foi significativo ($P = 0,28$). Na maioria dos estudos a análise ANOVA geralmente mostra um resultado significativo originando um modelo experimental quadrático (Gopinath et al., 2003; Singh and Satyanarayana, 2008; Salihu et al., 2011). A análise ANOVA para a produção da lipase neste estudo, mostrou que só o modelo matemático linear foi significativo, obtendo uma equação polinomial de primeira ordem (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de variância da ANOVA da produção de lipases por *T. sporotrichoides* utilizando óleo de licuri como fonte de carbono

	SS	df	MS	F	P
(1)Temperatura(L)	12,9671	1	12,96713	3,56265	0,117738
(2)Óleo (L)	1,5396	1	1,53964	0,42301	0,544137
(3)KH ₂ PO ₄ (L)	49,0337	1	49,03369	13,47174	0,014438
Lackof Fit	108,1235	11	9,82941	2,70058	0,141333
PureError	18,1987	5	3,63974		

Total SS	189,8627	19
-----------------	----------	----

As Figuras 5a, b e c, apresentam os gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais: óleo de licuri e K_2HPO_4 , temperatura e K_2HPO_4 , e óleo de licuri e temperatura. Pode-se verificar que as melhores condições para a produção das lipases em fermentação submersa por *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 apresentaram-se durante a relação entre a concentração de KH_2PO_4 e a concentração de licuri, que interagiram de forma positiva.



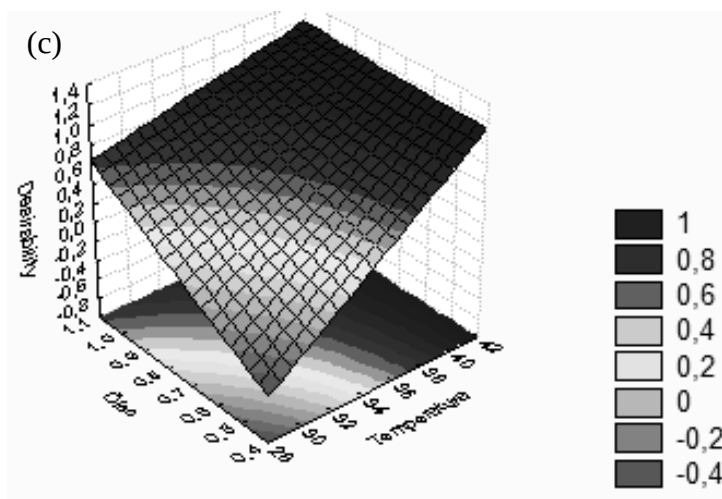


Figura 5. Gráficos de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais para a produção de lipases por *T. sporotrichoides* URM6630 (a) óleo de licuri e K_2HPO_4 , (b) temperatura e K_2HPO_4 , e (c) óleo de licuri e temperatura.

Basheer et al. (2011) trabalhando com a MSR verificaram que das variáveis testadas, o tempo de incubação e temperatura foram as mais significativas. Tais resultados diferem dos obtidos no presente estudo, no qual apenas a interação entre a concentração de KH_2PO_4 e a concentração do óleo de licuri foi significativa. Gopinath et al. (2003) trabalharam com *Geotrichum candidum* e otimizaram a produção das lipases usando a MSR. Os autores obtiveram atividade máxima de lipases de 87.7 U/mL, entretanto com substrato mais complexo com galactose (1,25% p/v), fonte de nitrogênio (2% p/v), Tween-80 (1% v/v), temperatura de 30 °C e elevado tempo de incubação (144 horas).

3.5. Caracterização enzimática parcial

3.5.1. Efeito ao pH

As avaliações dos efeitos de pH, temperatura e outras variáveis sobre a atividade enzimática são fundamentais para uma futura transposição de escala industrial em biotecnologia. Em nossos ensaios, o efeito do pH na atividade lipolítica apresentou ótima atividade em pH 10.0 (figura 6a). Singh et al., (2009), encontraram para *Geotrichum candidum* melhor atividade em pH 5.4. Os

valores de pH estudados para a definição do pH ótimo, estão de acordo com os dados obtidos na literatura numa faixa de 2,0 a 10,0 (Martins, 2001; Mahadik et al., 2002; Pastore et al., 2003).

Pinheiro et al. (2006), obteve pH ótimo de 7,0 para lipases produzidas em fermentação submersa de *Penicillium verrucosum*. Os estudos de Kumari et al (2012) e Yu et al (2007) trabalhando com a levedura *Yarrowia lipolytica* conseguiram atividade ótima com os valores de pH 7.0 e 8.0, respectivamente. Ciafardini et al (2006) produziram lipases utilizando amostras de *Williopsis californica* 1639 e *Saccharomyces cerevisiae* 1525 obtendo valor de pH ótimo de 6.0 e 7.5. Estes dados reforçam que as características das enzimas microbianas variam de acordo com a enzima em estudo, linhagem produtora, bem como com as condições de fermentação (autor).

3.5.2. Efeito à temperatura

Pôde-se verificar que o efeito da temperatura na atividade de lipases de *Trichosporon sporotrichoides* URM 6630 é maior a 40°C (figura 6b). A mesma temperatura ótima foi observada por Singh et al. (2009), ao caracterizar lipases produzidas por *G. candidum*, Kumari et al, 2012 com lipase produzida por *Yarrowia lipolytica*, Yu et al, 2007, *Yarrowia lipolytica*. Pinheiro e colaboradores em seus estudos para a produção de lipases verificaram que as melhores temperaturas para uma elevada atividade lipolítica foi no intervalo entre 30 a 40 ° C. Contudo no trabalho de Ciafardini e colaboradores, 2006 que utilizaram as leveduras *Williopsis californica* 1639 e *Saccharomyces cerevisiae* 1525 para produzir lipases, a temperatura para uma maior produção da enzima foi de 20 °C e 30 °C respectivamente. Dimitrijevic, e colaboradores 2012, trabalhando com a levedura *Candida antarctica* obtiveram 60°C como temperatura ótima para a enzima.

Santos et al, 2007 trabalharam com o mesmo Gênero desse estudo *Trichosporon spp* e obtiveram temperatura ótima para a atividade lipolítica entre 45-50°C. O que reforça os dados da literatura de que fatores como a origem e linhagem microbiana podem interferir diretamente nas

propriedades cinéticas e de estabilidade das enzimas. Além de tais fatores, as condições do ensaio, tempo de incubação, pH, temperatura, metodologia e o substrato utilizado também são importantes determinantes das características enzimáticas (Lopez et al., 2012; Carvalho et al., 2005).

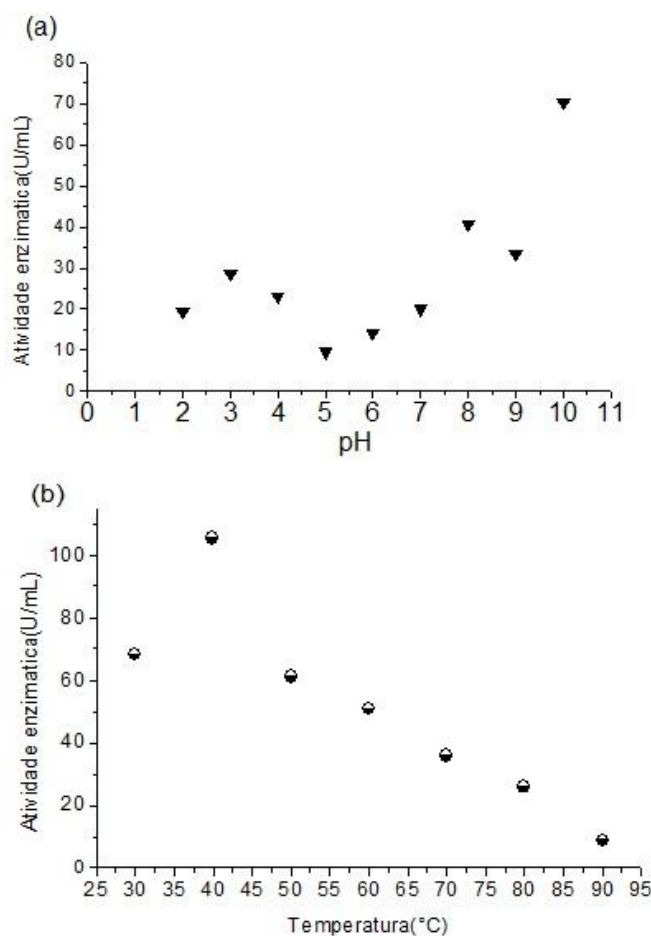


Figura 6. Efeitos de pH e temperatura sobre a atividade enzimática (condições e composição do meio definidas após MSR).

3.5.3. Efeito de íons metálicos, inibidores e solventes sobre atividade lipase

A enzima teve sua atividade ativada por sulfato de cobre, cloreto de cálcio, cloreto de cobalto, sulfato de zinco e sulfato de manganês. A lipase foi inibida por pepstatina. O isopropanol e o DMSO não alteraram a atividade da enzima. O EDTA inibiu consideravelmente a lipase, o que indica que a enzima é uma metaloprotease. Kumari e Gupta (2012), trabalhando com a levedura

Yarrowia lipolytica, suas atividades lipasicas foram ativadas por Ca^{2+} e inibidas por Fe^{2+} , Cd^{2+} e Ni^{2+} . O Mg^{2+} não afetou a atividade enzimática. A inibição por PMSF indicou que as lipases são serina hidrolases.

Yu et al. (2007), *Yarrowia lipolytica* Obtiveram que com acetona, metanol, etanol, isopropanol, DMSO a lipase reteve atividade quase 90% e a atividade de lipase foi ligeiramente aumentado por Ca^{2+} e Mg^{2+} . A atividade da lipase foi inibida por Zn^{2+} e Ni^{2+} e totalmente inibida por Cu^{2+} , mas não foi afetada pelo agente quelante EDTA, sugerindo que este não é uma lipase metaloenzima. A adição de 0,1% de Tween 80 e Span 65 aumentou ligeiramente a atividade da enzima, depois de 0,5 horas a 30 ° C; Triton X-100, Span 85, DTT e β -mercaptoetanol não afectam a actividade de lipase; mas SDS 1 mM teve um forte efeito inibitório na atividade da lipase.

Dimitrijevic, et al 2012, trabalharam com outro gênero de levedura, a *Candida antarctica* verificando o efeito de diversos íons (Na^{+} ; K^{+} ; NH_4^{+} ; Zn^{2+} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Cu^{2+} ; Mn^{2+} e Fe^{2+}) e detergente na atividade enzimática. Neste estudo os autores observaram o efeito desestabilizador do cálcio. Em concentrações baixas (0,1%), a lipase não foi afetada por Triton X-100, Triton 1339, Tween 20 e Tween 80. Em concentrações mais elevadas, a atividade foi inibida, exceto no caso de Triton X-100. Nenhum dos detergentes testados atuou como ativador da lipase.

4. Conclusão

Trichosporon sporotrichoides URM 6630, Trata-se do primeiro relato de produção de lipases por uma linhagem desta espécie, bem como da utilização de óleo de licuri (*Syagrus coronata* (Mart.) Becc) como substrato. Este micro-organismo torna-se bastante promissor para a produção de lipases, por produzir altos níveis destas enzimas, em temperatura moderada, utilizando substrato de baixo custo, um meio de cultura simples para a produção, minimizando assim os custos da produção.

5. Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo durante a realização deste projeto.

The authors acknowledge On the (CAPES) Coordination of Higher Education Personnel, the granting of scholarships for the realization of this project, FINEP ref. 2083/07, FACEPE APQ-0483-2.12/10 and CNPq 552410/2005-5. The authors also gratefully acknowledge the COOPERLIC, the Micoteca URM, of the Mycology Department at UFPE, Brazil.

6. Referência

- Abramic M, Lescic I, Korica T, Vitale L, Saenger W, Pigac J (1999). Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 25: 522-529.
- Araujo FV, Hagler AN (2010). Leveduras associadas a sedimentos de manguezais no Estado do Rio de Janeiro Brasil. *Rev. Gest. Cost. Integr.* 8:1-9.
- Barnett JA, Paine RW, Yarrow D (2000). Characteristics and identification. 3º Ed. Cambridge: Editora *Cambridge University Press*.
- Barros M, Fleuri LF, Macedo GA (2010). Seed lipases: sources, applications And properties – a review. *Brazil. J. Chemic. Engin.* 27:15-29.
- Basheer SM, Chellappan S, Beena PS, Sukumaran RK, Elyas KK, Chadrasekaran M (2011). Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol.* 1-12.
- Bautista-Gallego J, Rodríguez-Gómez F, Barrio E, Querol A, Garrido-Fernández A, Arroyo-López FN (2011). Exploring te yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *Internation. Journ. Food Microbiol.* 147:89–96.
- Bezerra CCF, Lima RF, Lazera MS, Wanke B, Borba CM (2006). Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39(3):241-244.
- Braz SCM, Souza-Motta CM, Massa DML, Neves RP, Magalhães OMC (2009). Viabilidade, confirmação taxonômica e caracterização enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Micoteca URM. *Rev. Soc. Bras. Médic.Trop.* 42(1): 63-66.
- Burkert JFM, Maugeri F, Rodrigues MI (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Biores. Technol.* 91:77–84.

- Carvalho PO, Calafatti SA, Marassi M, Silva DM, Contesini FJ, Bizaco R (2005). Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Quim. Nova*. 28(4):614-621,
- Carvalho PO, Campos PRB, Noffs MD, Oliveira JG, Shimizu MT, Silva DM (2003). Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química Nova*. 26:75-80.
- Ciafardini G, Zullo BA, Cioccia G, Iride A (2006). Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int. J. Food Microbiol.* 107:27-32
- Colen G, Junqueira RG, Moraes-Santos T (2006). Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J. Microb. Biotech.* 22:881–885.
- Coton E, Coton M, Levert D, Casaregola S, Sohier D (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *Internat. J. Food Microbiol.* 108:130-135.
- Dalmau E, Montesinosa JL, Lottib M, Casasa C (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enz. Microb. Technol.* 26: 657–663.
- Dantas EM, Aquino LCL (2010). Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. *Rev. Bras. Prod. Agroind.* 12(1):81-87.
- Darvishi F, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F (2009). Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica* Yeast. *J. Biomed. Biotech.* 1-7.
- Demir BS, Tukul SS (2010). Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. *J. Molec. Catalysis B: Enzymatic.* 64:123-128.
- Dimitrijevic´A, Velic´kovic´ D, Bihelovic´ F, Bezbradica D, Jankov R, Milosavic N (2012). One-step, inexpensive high yield strategy for *Candida antarctica* lipase A isolation using hydroxyapatite. *Bioresource Technol.* 107:358–362.
- Domsch KH, Gams W 1993. Compendium of soil fungi. 2º Ed. Regensburg: Editora IHW-verlang.
- Farias CMF, Souza OC, Sousa MA, Cruz R, Magalhães OMC, Medeiros EV, Moreira KA, Souza-Motta CM (2015). High-level lipase production by *Aspergillus candidus* URM 5611 under solid state fermentation (SSF) using waste from *Siagrus coronata* (Martius) Becari. *African J. Biotechnol.* 14(9):820-828.
- Figueiredo, M.B (2001). Métodos de preservação de fungos patogênicos. *Biológico*. 63: 73-82.
- Gopinath SCB, Hilda A, Priya TL, Annadurai G, Anbu P (2003). Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19:681-689.
- Hama S, Yoshida A, Nakashima K, Noda H, Fukuda H, Kondo A (2010). Surfactant-modified yeast whole-cell biocatalyst displaying lipase on cell surface for enzymatic production of structured lipids in organic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:537–543.

- Hankin L, Anagnostakis SL (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 67:597-607.
- Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000). Atlas of Clinical fungi . 2° Ed Netherlands: Editora Centralbureau voor Schimmencultures.
- Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Biores. Technol.* 100:4535-4538.
- Kim MH, Kim HK, Lee JK, Park SY, Oh TK (2000). Thermostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high level production, purification and calcium-dependent thermostability. *Bioscience*. 280–286.
- Klibanov AM (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 409:241–246.
- Kong WB, Hua SF, Cao H, Muc YW, Yang H, Song H, Xia CG (2012). Optimization of mixotrophic medium components for biomass production and biochemical composition biosynthesis by *Chlorella vulgaris* using response surface methodology. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 43:360–367.
- Kumari A, Gupta R (2012). Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 34:1733–1739.
- Kumari A, Verma VV, Gupta R (2012). Comparative biochemical characterization and in silico analysis of novel lipases Lip11 and Lip12 with Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *World J Microbiol Biotechnol* 28:3103–3111.
- Leal MCMR, Cammarota MC, Freire DMG, Sant’anna GLJR (2002). Hydrolytic enzymes as coadjuvants in The anaerobic treatment of dairy Wastewaters. *Brazil. J. Chemical Engineer.* 19:175-180.
- Liu W, Zhu W, Lu Y, Kong J, Ma G (1999). Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* Sl409. *Process Biochemistry* 33: 331-336.
- López FNA, Gil VR, Gallego JB, Gomez FR, Diaz RJ, García PG, Simon AQ, Fernandez AG (2012). Potential benefits of the application of yeast starters in table olive Processing. *Front. Microbiol.* 1-11
- Macêdo GA, Park YK, Pastore GM (1997). Partial purification and characterisation of in extracellular lipase a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Revista de Microbiologia* 28: 90-95.
- Mahadik ND, Puntambekar US, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state Fermentation. *Process Biochem.* 38:715-721.
- Martins TS (2001). Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. Dissertação de Mestrado. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Najjar S, Robert C, Guérin M (2011). Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89:1947–1962.

- Nandini KE, Rastogi NK (2009). Reverse micellar extraction for downstream processing of lipase: Effect of various parameter on extraction. *Proc. Biochem.* 44:1172-1178.
- Pastore GM, Costa VSR, Koblitz MGB (2003). Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciê. Tecnol. Aliment.* 23(2):135-140.
- Pereira EO, Tsang A, McAllister TA, Menassa R (2013). The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. *Biotechnol. Biofuels.* 111(6):1-10.
- Pinheiro TLF, Menoncin S, Domingues NM, Oliveira D, Treichel H, Di Luccio M, Freire DMG (2008). Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Ciência e Tecn. Alimentos.* 28(2): 444-450.
- Pizarro MC, Branes A, Markovits G, Fernández-Lorente JM, Guisán R, Chamy L, Wilson L (2012). Influence of different immobilizations techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. *J. Mol. Catalysis B: Enzym.* 78:111– 118.
- Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB (2006). Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. *Bioch. Engin. J.* 27(3):287-294.
- Reis RLS, Leão NSR, Souza AF, Silva GKB, Luna MAC, Silva CAA, Okada K. (2015). Evaluation of biotechnological potential of *aspergillus parasiticus* ucp 1281 in the wastewater biotreatment of dairy industry and lipids production . *E-xacta* 8(1): 31-42.
- Ribeiro BD, Castro AM, Zarur MA, Freire DMG (2011). Production and use of lipases in bioenergy: a review from The feedstocks to biodiesel production. *Enz. Resear.*1-16.
- Rigo E, Rigoni RE, Lodea P, Oliveira D, Freire DMG, Treichel H, Luccio M (2008). Comparison of Two Lipases in the Hydrolysis of Oil and Grease in Wastewater of the Swine Meat Industry. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47:1760-1765.
- Rigo E, Polloni AE, Remonato D, Arbter F, Menoncin S, Oliveira JV, Oliveira D, Treichel H, Kalil SJ, Ninow JL, Luccio M (2010). Esterification Activity of Novel Fungal and Yeast Lipases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162:1881–1888.
- Roveda M, Hemkemeier M, Colla LM (2010). .Evaluation of lipase production using different strains of microorganisms isolated from dairy effluent through submerged fermentation. *Ciê. Tecn. Alim.* 30(1): 126-131.
- Salihu A, Alama MDZ, AbdulKarima MIH, Salleh M (2011). Optimization of Lipase Production by *Candida cylindracea* in Palm Oil Mil Effluente Bases Médium Using Statistical Experimental Design. *J. Mol. Catalysis B: Enzym.* 69:66–73.
- Santos JA, Amaral COM, Araújo TAS, Fernandes KGC, Chaves AC, Morais MMC (2007). Isolation of a lipase producing *Trichosporon spp.* And enzyme extraction by two-phase aqueous system. *Braz. J. Microbiol.* 38:62-64.

- Santos RR, Muruci LNM, Santos LO, Antoniassi R, Silva JPL, Damaso MCT (2014). Characterization of Different Oil Soapstocks and Their Application in the Lipase Production by *Aspergillus niger* under Solid State Fermentation. *J. Food Nut. Research*. 2(9): 561-566.
- Sierra GAA (1957). Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonine van Leeuwenhoeck* 28: 15-22.
- Silva VJS (2009). Detecção enzimática de culturas de *Trichosporon* mantidas na Micoteca URM. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas, Bacharelado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Silva-Neves KC, Porto ALF, Teixeira MFS (2006). Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. *Acta Amazonica* 36:299–306.
- Singh A, Bhattacharyya MS, Banerjee UC (2009). Purification and characterization of carbonyl reductase from *Geotrichum candidum*. *Proc. Bioch.* 44: 986-991.
- Singh B, Satyanarayana T (2008). Phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in solid state fermentation and its potential applications. *Bioresource Technol.* 99: 2824–2830.
- Sugihara A, Shimada Y, Nakamura M, Nagao T, Tominaga Y (1994). Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum candidum* lipases. *Protein Eng.* 7:585-588.
- Sun YF, Lin Y, Zhang JH, Zheng SP, Ye YR, Liang XX, Han SY (2012). Double *Candida antarctica* lipase B co-display on *Pichia pastores* cell surface based on a self-processing foot-and-mouth disease virus 2^a peptide. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
- Treichel H, Oliveira D, Mazutti MA, Di Lucio M, Oliveira JV (2010). A review on microbial lipases production. *Food Bioproc. Technol.* 3:182-196.
- Watanabe N, Ota Y, Minoda Y, Yamada K (1977). Isolation and identification of alkaline lipases producing microorganisms, cultural conditions and some properties. *Agric Biol Chem.* 41:1353-1348.
- Wenzel JB, Moresco AAA, Vilas-Boas EF, Burin AG, Souza RO (2013). Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de soja. *Persp. on line Ciên. Biol.Saúde*. 9(3) 1-15.
- Yu M, Qin S, Tan T (2007). Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*. 42:384-391.
- Zhang YY, Liu JH (2010). Purification and in situ immobilization of lipase from a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase systems. *J. Chromatog. B.* 878:909-912.
- Zhao X, Qi F, Yuan C, Du W, Liu D (2015). Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. *Renew. Sust.e Energy Rev.* 44:182–197.

