



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

MARIA DE FÁTIMA MATOS DE FREITAS

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BAGAÇO DE CAJU
UTILIZANDO FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO.**

**FORTALEZA
2017**

MARIA DE FÁTIMA MATOS DE FREITAS

PRODUÇÃO DE LIPASES POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BAGAÇO DE CAJU
UTILIZANDO FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Lígia Rodrigues

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D32p de Freitas, Maria de Fátima Matos.
Produção de lipases por leveduras isoladas do bagaço de caju utilizando fontes alternativas de carbono e nitrogênio. / Maria de Fátima Matos de Freitas. – 2017.
104 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profa. Dra. Lígia Rodrigues.
1. Lipase. 2. Cultivo submerso. 3. Candida rugosa. 4. Candida tropicalis. 5. Meyerozyma caribbica. I.
Título.

CDD 660

MARIA DE FÁTIMA MATOS DE FREITAS

PRODUÇÃO DE LIPASES POR LEVEDURAS ISOLADAS DO BAGAÇO DE CAJU
UTILIZANDO FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO E NITROGÊNIO.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 13/06/2017

Prof.^ª Dr.^ª Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dr.^ª Juliana Rabelo de Sousa
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
(Embrapa)

Prof.^ª Dr.^ª Lígia Rodrigues (Coorientadora)
Universidade do Minho

Prof.^ª Dr.^ª Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará -UFC

Prof.^ª Dr.^ª Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, por toda força e inspiração.

*A minha mãe Aurenice, ao meu irmão Charles,
a minha irmã Fabiana e ao meu esposo
Domingos Sales.*

AGRADECIMENTOS

Gratidão eterna a Deus que me protege, acompanha e ilumina cada dia de minha vida.

À minha família, ao meu pai Luiz (*In Memoriam*), minha mãe Aurenice, minha irmã Fabiana, e meu irmão Charles que sempre se sacrificaram para me ajudar. Família unida com base na fé em Deus e no amor soberano!

Aos meus príncipes Luiz e Lucas que me ensinam a cada dia ser uma pessoa melhor. Desculpa por tanto trabalho, mas um dia vão entender e descobrir que a vida é assim mesmo cheia de desafios.

Ao meu tio Edvaldo que sempre foi meu exemplo e me deu suporte em todos os momentos, principalmente quando estive em Portugal.

À minha prima Aurelice que, a todo o momento, me apoiou e não mediu esforços para atravessar o oceano Atlântico e levar meus preciosos até a mim.

Ao meu esposo Domingos por estar sempre do meu lado, lutando e almejando os mesmos objetivos que eu.

À prof^a. Dr^a. Luciana por toda sua contribuição profissional, pela dedicação e paciência em todos os momentos. Obrigada por tudo, pelo incentivo e pelas sinceras palavras que me fizeram uma profissional melhor.

À prof^a. Dr^a. Lígia Rodrigues, um exemplo de orientadora e pessoa humana distinta, agradeço toda dedicação e paciência para o desenvolvimento deste trabalho.

À prof^a. Dr^a. Valderez pela amizade, carinho e alegria de sempre aprender e partilhar experiências.

Ao prof. Dr. André pelo apreço que tenho. Por toda contribuição, incentivo e clareza de melhorias neste trabalho.

À prof^a. Dr^a. Sueli Rodrigues pelo afeto e toda ajuda em seu laboratório. Obrigada pela participação na banca, pelas correções e melhorias para o trabalho final.

A todos os professores da Engenharia Química pela oportunidade de aprender um pouco mais com cada um em suas disciplinas. Em especial, a pessoa do professor Hosiberto Santana pelas palavras de incentivo nos corredores. Um professor que guardo muitas coisas boas pela sua simplicidade e veracidade.

À prof^a. Dr^a. Taciana Cavalcanti, professora da UFRPE, pela disposição em participar da banca e relevante colaboração no trabalho final.

À Dr^a. Juliana Rabelo, pesquisadora da Embrapa, pela a importante participação na banca e todas as contribuições.

Ao Guilherme pela sua experiência, lealdade e dedicação, mostrando-se um profissional de resiliência e com grande capacidade de seguir em frente.

Ao Lucas, Débora e Samara pelo aprendizado que obtivemos, pela troca de experiência e carinho que tiveram sempre por mim.

A Sara e a Eduardo, ela portuguesa e ele espanhol, que nos auxiliaram com tanta precisão, só posso dizer muito obrigada. Pela troca de conhecimentos, sabedoria e simplicidade.

Às amigas Camilla, Dayana, Jéssica, Jocélia, Jouci, Gerlândia, Graciane, Marlene, Nathália, Renata e Tatiane Maciel que agradeço muito, pois me trouxeram suavidade e força em todos os momentos que precisei.

A todos meus amigos do GPBIO, Bruna, Brenda, Carlinha, Ítalo, Juliana, Kamilly, Kimberle, Maísa, Nathan, Rayanne, Renata, Sandy e Tiago. E aos amigos que não fazem mais parte do GPBIO, Cris Rabelo, Cleiton, Maria Cristiane e Tigressa. E também aos amigos de outros grupos da UFC, Adriana Dutra, Ana Cristina, Carol, Cívita, Diego, Lívia, Regiane e Valéria que fizeram parte da minha vida no dia a dia na Universidade, lutando pelos mesmos objetivos.

A todos meus amigos do LF, Andréa Santos, Ana Rodrigues, Aloia, Clarisse, Daniel, Karla Texeira, Karol Caitano, Lina Fernandes, Meyrielle, Rita Martins, Rutilene e Xanel. Obrigada pela amizade, carinho e aprendizado. Nunca me esquecerei dos lanches, das prendas e das desculpas.

A todos os amigos do grupo da Comunidade Católica Shalom de Portugal que conheci: Elaine, Jonas, Marcela, Maria Vanielle, Vanda, Patrick e Pedro.

À Igreja evangélica em Portugal que me acolheu muito bem também, em especial Catarina e Rute.

Ao padre Erasmos da Igreja Nossa Senhora Aparecida, professor na Universidade Católica de Quixadá, um conhecedor da Palavra e incentivador do desenvolvimento humano.

A todos os meus familiares, tios, primos e cunhados que também sempre torceram por mim.

À CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro. Ao CNPq pela bolsa do Programa Ciências sem Fronteira.

“Enquanto houver vontade de lutar haverá
esperança de vencer.”

(Santo Agostinho)

RESUMO

As enzimas lipolíticas são capazes de catalisar uma grande variedade de reações e são altamente específicas. Para a biotecnologia surge a necessidade da busca de novos microorganismos para essa produção. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de lipases por duas leveduras isoladas do bagaço de caju, *Candida tropicalis* URM 7057 e *Meyerozyma caribbica* LABIOTEC 4 e comparar pela levedura *C. rugosa* NRRL Y-95. Inicialmente foram testados meios de cultura sintéticos para a produção da enzima. O meio sintético C (contendo glicose, KH_2PO_4 , extrato de levedura, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, peptona e ácido oleico) foi o que apresentou melhor resultados de atividade intracelular (282 ± 14 U/L em 48 horas de cultivo). Em seguida, 4 meios de cultura alternativos foram formulados com resíduos, além de sulfato de amônia e peptona, e avaliados na produção da enzima de interesse. O meio 01 continha melação, o meio 02, milhocina (CSL - corn steep liquor), o meio 03, águas residuais da produção do azeite (olive mill wastewater - OMW) e o meio 04, todos eles. O meio 04 se mostrou melhor por permitir a produção de maiores quantidades da enzima lipolítica, provavelmente por apresentar uma quantidade maior de nutrientes para levedura. Um planejamento fatorial fracionado foi conduzido para se verificar a influência das concentrações dos resíduos na produção da lipase. A milhocina apresentou efeito positivo nessa produção, propiciando atividade extracelular de lipase de 587 ± 5 U/L, em 24 horas de cultivo. O uso de biorreator tipo tanque agitado favoreceu a produção de lipases, visto que as atividades da lipase produzida por *C. rugosa* em biorreator foram maiores que as produzidas em frascos (600 U/L em biorreator e 400 U/L em frascos, após 48 horas de cultivo), e para levedura *C. tropicalis* a atividade enzimática também se apresentou em quantidade maior (próximo a 500 U/L, comparado a 400 U/L em frascos). O crescimento da biomassa da levedura *C. tropicalis* em frascos e em biorreator foi similar até 48 horas. A enzima produzida por *C. rugosa* tem massa molar próxima a 60 KDa, com pH ótimo em torno de 7,0 e temperatura ótima de 40 °C. A caracterização bioquímica parcial da lipase produzida por *C. tropicalis* mostrou que ela apresenta temperatura ótima de 60 °C para o extrato intracelular e 70 °C para o extracelular, pH ótimo igual a 7.0. Após adsorção da enzima em octil-agarose, foi possível identificar, por análise de zimograma e por eletroforese, bandas próximas às obtidas para a lipase de *C. rugosa* comercial (60 KDa, 45 KDa e 22 KDa).

Palavras chave: Lipase. Cultivo submerso. *Candida rugosa*. *Candida tropicalis*. *Meyerozyma caribbica*.

ABSTRACT

Lipolytic enzymes can catalyze a wide variety of reactions and are highly specific. For biotechnology, the need arises for the search for new microorganisms for this production. The objective of this work was to evaluate lipase production by two yeasts isolated from cashew bagasse, *Candida tropicalis* URM 7057 and *Meyerozyma caribbica* LABIOTEC 4 and to compare it with *C. rugosa* yeast NRRL Y-95. Synthetic culture media were initially tested for production of the enzyme. Synthetic medium C (containing glucose, KH_2PO_4 , yeast extract, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, peptone and oleic acid) showed the best intracellular activity results (282 ± 14 in 48 h of culture). Then, alternative medium culture was formulated with residues, in addition to ammonium sulfate and peptone, and evaluated the production of the enzymes of interest. Medium culture 01 contained molasses, medium culture 02, corn steep liquor (CSL), medium culture 03, olive mill wastewater (OMW) and medium culture 04, all of them. Medium 04 was better because it allowed the production of larger amounts of lipase, probably because it had a higher amount of nutrients for yeast. An experimental design was conducted to verify the influence of the concentrations of residues on lipase production. Corn steep liquor (CSL) had a positive effect on this production, providing extracellular lipase activity of 587 ± 5 U/L, in 24 h of culture. The use of stirred tank bioreactors favored the production of lipases, since the activities of the lipase produced by *C. rugosa* in bioreactor were higher than those produced in flasks (600 U/L in bioreactor and 400 U/L in flasks, after 48 h of culture) and for yeast *C. tropicalis* the enzymatic activity also presented in a larger quantity (close to 500 U/L, compared to 400 U/L in flasks). Biomass growth of yeast biomass *C. tropicalis*, in flasks and in bioreactor, was similar up to 48 h. The enzyme produced by *C. rugosa* has a molar mass close to 60 kDa, with an optimum pH of 7.0 and an optimum temperature of 40 °C. The partial biochemical characterization of the lipase produced by *C. tropicalis* showed that it presents an optimum temperature of 60 °C for the intracellular extract and 70 °C for the extracellular extract, optimum pH equal to 7.0. After adsorption of the enzyme in octyl-agarose, it was possible to identify, by zymogram analysis and by electrophoresis, bands close to those obtained for *C. rugosa* commercial lipase (60 kDa, 45 kDa and 22 kDa).

Keywords: Lipase. Submerge culture. *Candida rugosa*. *Candida tropicalis*. *Meyerozyma caribbica*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama estrutural da lipase de <i>C. rugosa</i> em momentos aberto e fechado da conformação polipeptídica. A conformação fechada está representada na cor amarela, enquanto a conformação aberta está destacada em vermelho. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho.....	24
Figura 2 -	As leveduras <i>Candida tropicalis</i> (a) e <i>Meyerozyma caribbica</i> (b) cultivadas por placas em meio <i>Ágar Sabouraud</i> (AS).....	26
Figura 3 -	Fluxograma das etapas de cultivo e purificação parcial da produção de lipases.....	37
Figura 4 -	Lipase produzida por <i>C. rugosa</i> em meio de cultura sintético, a 30 °C e pH 7,0.....	53
Figura 5-	Atividade extracelular e intracelular da lipase produzida pela <i>C. tropicalis</i> nos 4 meios alternativos. Lipase extracelular 24 h (■), lipase intracelular 24 h (■), lipase extracelular 48 h (■), lipase intracelular 48 h (■).....	55
Figura 6-	Atividade extracelular e intracelular da lipase produzida pela <i>M. caribbica</i> nos 4 meios alternativos. Lipase extracelular 24 h (■), lipase intracelular 24 h (■), lipase extracelular 48 h (■), lipase intracelular 48 h (■).....	55
Figura 7-	Efeito dos três substratos, milhocina, OMW (olive mill wastewater) e melaço na atividade extracelular (a) e intracelular (b) da lipase. 2^{3-1} modelo experimental fracionado, MS residual: 0.0059499.....	59
Figura 8-	Efeito da razão carbono e nitrogênio na atividade extracelular (■) e intracelular da lipase produzida (●) por <i>C. rugosa</i>	61
Figura 9-	Produção de lipase por <i>C. rugosa</i> usando meio com resíduos: biomassa, frascos (■), biorreator (■).....	63
Figura 10-	Produção de lipase por <i>C. rugosa</i> usando meio com resíduos: atividade extracelular, frascos (■), biorreator (■).....	64
Figura 11-	Produção de lipase por <i>C. rugosa</i> usando meio com resíduos: atividade intracelular, frascos (■), biorreator (■).....	64
Figura 12-	Produção de lipase por <i>C. tropicalis</i> em biorreator usando meio sintético: biomassa (■), açúcar (■), atividade extracelular (◆) e intracelular (▶).....	65

Figura 13-	Produção de lipase por <i>C. tropicalis</i> usando meio com resíduos: biomassa, frascos (■), biorreator (■).....	65
Figura 14-	Produção de lipase por <i>C. tropicalis</i> usando meio com resíduos: atividade extracelular, frascos (■), biorreator (■).....	66
Figura 15-	Produção de lipase por <i>C. tropicalis</i> usando meio com resíduos: atividade intracelular, frascos (■), biorreator (■).....	66
Figura 16-	Efeito do pH na atividade extracelular (■) e intracelular (●). Lipase produzida por <i>C. rugosa</i> em 24 h de cultivo em meio sintético. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade enzimática foi expressa em atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (590 U/L) e atividade intracelular (443 U/L).....	69
Figura 17-	Efeito da temperatura na atividade extracelular (■) e intracelular (●) da lipase. Lipase produzida por <i>C. rugosa</i> em 24 h de cultivo, em meio sintético. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade enzimática foi expressa em atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (550 U/L) e atividade intracelular (330 U/L).....	69
Figura 18-	Efeito do pH na atividade extracelular (■) e intracelular (●). Lipase produzida por <i>C. tropicalis</i> em 24 horas de cultivo em meio com resíduos. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (666 U/L) e atividade intracelular (503 U/L).....	70
Figura 19-	Efeito da temperatura na atividade extracelular (■) e intracelular (●) da lipase. Lipase produzida por <i>C. tropicalis</i> em 24 horas de cultivo em meio com resíduos. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (553 U/L) e atividade intracelular (457 U/L).....	71
Figura 20-	Perfil eletroforético da lipase intracelular (linhas 3 a 6) e da lipase extracelular (linhas 7 a 10) produzida por <i>C. rugosa</i>	72
Figura 21-	Perfil eletroforético da lipase intracelular, linhas 2 e 3, produzidas por <i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i> , respectivamente.....	73

- Figura 22- Perfil eletroforético das lipases produzida por *C. tropicalis*. Linha 1: Marcador. Linha 2: *C. rugosa* comercial. Linha 3: Lipase extracelular recuperada com 1 % de Triton X-100. Linha 4: Sobrenadante do processo de adsorção da lipase em octil-agarose. Linha 5: Lipase Intracelular recuperada com 0,1 % de Triton X-100. Linha 6: Lipase Intracelular recuperada com 0,1 % de Triton X-100. Linha 7: Enzima lipase adsorvida em octil-agarose. Linha 8: Extrato inicial..... 74
- Figura 23- Zimograma contendo pNFL, como substrato, e *phenol red* (0,01 %), como agente revelador. Em ordem, estão: Lipase de *Candida rugosa* comercial (CRC) (linha 1) e de *Candida tropicalis* intracelular (CTI) (linha 2) (Figura 18-a); Lipase comercial de *C. rugosa* (linha 1), *C tropicalis* E (linha 2), *Candida tropicalis* I (linha 3) (Figura 18-b)..... 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Levantamento de micro-organismos produtores de lipase ao longo dos anos.....	23
Tabela 2 -	Principais substratos utilizados em meios de cultivos para produção da lipase.....	27
Tabela 3 -	Aplicação industrial das lipases.....	31
Tabela 4 -	Composição dos meios sintéticos.....	39
Tabela 5 -	Composições do meio de cultura com meios alternativos agroindustriais para produção de lipase por <i>C. rugosa</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i>	39
Tabela 6 -	Produção de lipase por <i>C. rugosa</i> , utilizando-se variações na concentração dos resíduos do meio número 4.....	41
Tabela 7 -	Atividade do extrato enzimático de <i>C. rugosa</i> , lipase intracelular, obtido em diferentes tempos (2 e 4 min) de rompimento celular utilizando ultrassom de ponteira.....	48
Tabela 8 -	Teste de hidrólise por ésteres sintéticos da lipase produzida por <i>C. tropicalis</i>	49
Tabela 9 -	Lipase produzida por <i>C. tropicalis</i> , <i>M. caribbica</i> e <i>C. rugosa</i> em meio de cultura sintético com adição de vitaminas a 30 °C e pH inicial 6,0. Atividade intracelular (■) e atividade extracelular (■).....	50
Tabela 10 -	Atividade da lipase produzida por <i>C. tropicalis</i> em 24 h, 48 h e 72 h de cultivo em meio sintético C utilizando pNFL como substrato	51
Tabela 11 -	Produção de lipase por <i>C. rugosa</i> nos meios de culturas A, B e C em 72 h de cultivo.....	52
Tabela 12 -	Atividade enzimática extracelular para as leveduras <i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i> no meio 4.....	56
Tabela 13 -	Atividade enzimática da lipase produzida por <i>C. rugosa</i> , depois de 24 h de cultivo, utilizando diferentes meios de cultura (reportado no item 4.1.3).....	57
Tabela 14 -	Atividade proteolítica das leveduras <i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i> . Amostras produzidas através de cultivo em frascos utilizando meio com	

	resíduos por 48 horas de cultivo.....	58
Tabela 15 -	Atividade proteolítica de <i>C. rugosa</i> . Amostras produzidas em cultivo submerso em reator em meio com resíduos.....	58
Tabela 16 -	Resultados de fermentações em frascos pelas leveduras <i>C. tropicalis</i> , <i>M. caribbica</i> e <i>C. rugosa</i> em meio 4 modificado.....	62
Tabela 17 -	Análise de açúcar consumido através da análise de DNS nas fermentações em biorreator das leveduras <i>C. rugosa</i> e <i>C. tropicalis</i>	67
Tabela 18 -	Sumário do procedimento de purificação da lipase produzida por <i>C. rugosa</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>C. rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>
CRC	Lipase comercial de <i>Candida rugosa</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. tropicalis</i> E	Lipase de <i>Candida tropicalis</i> extracelular
<i>C. tropicalis</i> I	Lipase de <i>Candida tropicalis</i> intracelular
CSL	<i>Corn steep liquor</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>M. caribbica</i>	<i>Meyerozyma caribbica</i>
MW	Molecular Weight
OMW	Olive mill wastewater
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor/fluoreto de fenil sulfonil (inibidor de protease)
<i>pNFL</i>	p-nitrofenol laurato
SDS	Docecil sulfato de sódio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
TEMED	N,N,N,N-tetrametil etilendiamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Lipases.....	22
2.2	Micro-organismos produtores.....	22
2.2.1	<i>C. rugosa</i>	24
2.2.1.1	<i>Lipase produzida por C. rugosa</i>	24
2.2.2	<i>C. tropicalis e M. caribbica</i>	25
2.3	Fatores que influenciam a produção das lipases.....	26
2.3.1	<i>Cultivos microbianos</i>	26
2.3.2	<i>Meios de culturas e condições</i>	27
2.3.3	<i>Resíduos agroindustriais</i>	29
2.4	Aplicação das lipases.....	30
2.4.1	<i>Alimentos</i>	30
2.4.2	<i>Oleoquímica</i>	31
2.4.3	<i>Detergentes</i>	32
2.4.4	<i>Química farmacêutica</i>	32
2.5	Atividade lipolítica.....	32
2.6	Métodos de extração.....	33
2.7	Purificação de lipases.....	34
2.8	Biorreatores.....	34
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Micro-organismos	37
4.2	Produção da enzima.....	37
4.2.1	<i>Propagação do inóculo</i>	38
4.2.2	<i>Meio sintético com adição de vitaminas para produção de lipases por C. rugosa e C. tropicalis</i>	38
4.2.3	<i>Meio sintético para produção de lipases por C. rugosa, C. tropicalis e M.</i>	38

	<i>caribbica</i>	
4.2.4	<i>Meio com resíduos para produção de lipases por C. rugosa, C. tropicalis e M. caribbica</i>	39
4.2.5	<i>Esterilização</i>	39
4.3	Definição da reação modelo para determinação da medida da atividade enzimática	40
4.4	Teste ultrassônico para rompimento das células	41
4.5	Avaliação da influência da concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção de lipase por C. rugosa	41
4.6	Determinação da razão carbono-nitrogênio	42
4.7	Purificação parcial das enzimas produzidas	42
4.7.1	<i>Por precipitação das proteínas</i>	42
4.7.2	<i>Por interação hidrofóbica</i>	42
4.8	Métodos analíticos	43
4.8.1	<i>Medida de proteína</i>	43
4.8.2	<i>Medida do açúcar residual</i>	43
4.8.3	<i>Crescimento celular</i>	44
4.8.4	<i>Atividade de lipase</i>	44
4.8.5	<i>Determinação da atividade de protease</i>	44
4.8.6	<i>Preparo do inibidor de protease</i>	45
4.9	Produção em biorreator	45
4.10	Caracterização da enzima	45
4.10.1	<i>Temperatura e pH ótimos</i>	45
4.10.2	<i>Eletroforese</i>	46
4.10.3	<i>Zimograma</i>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	48
5.1	Ensaio preliminares	48
5.1.1	<i>Avaliação do tempo necessário para o rompimento celular e liberação da enzima</i>	48
5.1.2	<i>Teste de metodologia de determinação da atividade enzimática</i>	49
5.1.3	<i>Meio sintético inicial com adição de vitaminas</i>	50
5.1.3.2	<i>C. tropicalis, M. caribbica e C. rugosa</i>	50
5.2	Avaliação do meio de cultura sintético para produção de lipases	51

5.2.1	<i>C. tropicalis</i>	51
5.2.2	<i>M. caribbica</i>	52
5.2.3	<i>C. rugosa</i>	52
5.3	Avaliação do meio de cultura contendo resíduos para produção de lipases	54
5.3.1	<i>M. caribbica</i> e <i>C. tropicalis</i>	54
5.3.2	<i>C. rugosa</i>	56
5.4	Análise da produção de proteases	57
5.4.1	<i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i>	57
5.4.2	<i>C. rugosa</i>	58
5.5	Influência da concentração de substratos na concentração de lipases	58
5.6	Avaliação da influência da razão C/N na produção de lipase por <i>C. rugosa</i>	60
5.7	Comparativo entre as leveduras avaliadas	61
5.8	Produção em biorreator	63
5.8.1	<i>C. rugosa</i>	62
5.8.2	<i>C. tropicalis</i>	64
5.9	Caracterização das enzimas	68
5.9.1	Efeito da temperatura e pH na atividade da enzima produzida	68
5.9.1.1	<i>C. rugosa</i>	68
5.9.1.2	<i>C. tropicalis</i>	70
5.9.2	Eletroforese	71
5.9.2.1	<i>C. rugosa</i>	71
5.9.2.2	<i>C. tropicalis</i> e <i>M. caribbica</i>	72
5.9.3	Processo de purificação	74
5.9.3.1	<i>C. rugosa</i>	74
5.9.3.2	<i>C. tropicalis</i>	75
5.9.4	Zimograma	76
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	78
	APÊNDICE	97

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol-acil-hidrolases E.C.3.1.1.3) têm uma ampla faixa de aplicação, porque são capazes de hidrolisar triglicerídeos para diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (COLLA *et al.*, 2013; SHARMA *et al.*, 2001), assim como catalisam reações de esterificação, transesterificação e interesterificação de lipídios. Elas podem ser aplicadas em muitas áreas, como na química fina (VILLENEUVE *et al.*, 2000), em detergentes (HASAN *et al.*, 2006), no tratamento de águas residuais (WU *et al.*, 2008), na determinação do sabor de produtos lácteos (SUZZI *et al.*, 2001; FICKERS *et al.*, 2011), na área farmacêutica e na médica (RIGO *et al.*, 2009; BURKERT *et al.*, 2004), entre outros. Para o mercado de enzimas, as lipases têm emergido como um relevante biocatalisador que contribui com a bioindústria de lipídios (TREICHEL *et al.*, 2010).

O elevado custo dos extratos enzimáticos comerciais e a falta de indústrias no Brasil, levou ao desenvolvimento da presente tese de doutorado, que se propôs a estudar a produção de lipases. O grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBIO), do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal do Ceará (UFC), trabalha há muito tempo com as lipases comerciais. Ao longo dos anos vários estudos foram realizados por nosso grupo com essas enzimas, como trabalhos de imobilização em diversos materiais (fibra de coco verde (BRÍGIDA, 2010), nanopartículas (SOUZA, 2013), organo-gel (CAVALCANTE, 2015), bagaço de caju (PACHECO, 2016) e SBA-15 (RIOS *et al.*, 2016).

O trabalho se iniciou através de uma colaboração entre o GPBIO o LABIOTEC (Laboratório de Biotecnologia da UFC), que já vinha trabalhando na seleção e identificação de micro-organismos isolados a partir de resíduos agroindustriais, e o Laboratório de Fermentação (Universidade do Minho), que tem larga experiência na utilização de resíduos para a formulação de meios de cultivo. Dentre esses micro-organismos, duas leveduras com potencial para a produção de esterases (SÁ *et al.*, 2013) *Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica*, foram identificadas de acordo com os padrões estabelecidos pelo LABIOTEC (SILVA *et al.*, 1997) e doadas ao GPBIO.

A maioria das enzimas de uso industrial é de origem microbiana e são produzidas em cultivos aeróbicos submersos convencionais, o que permite um maior controle das condições de crescimento do que no caso das fermentações de estado sólido (HASAN *et al.*, 2006; CHEETHAM, 1995). A quantidade de lipase produzida depende de alguns fatores,

como composição do meio de cultura, concentração de nitrogênio, concentração de sais inorgânicos, temperatura, pH, oxigenação, agitação, fontes de carbono. E ainda os lipídios, tais como a manteiga e os ácidos graxos de óleo de azeitona podem estimular a produção de lipase (MALDONADO *et al.*, 2012; PUTHLI *et al.*, 2006; BURKERT *et al.*, 2004).

Vários estudos têm sido realizados visando à otimização dos meios de cultura para produção de lipases usando diferentes fontes de carbono, nitrogênio e indutores (TAKAÇ *et al.*, 2010; RAJENDRAN; THANGAVELU, 2007; RUCHI *et al.*, 2008; KAUSHIK *et al.*, 2006; CIAFARDINI *et al.*, 2006; MONTESINOS *et al.*, 2003; MURALIDHAR *et al.*, 2001; FADILOGLU e ERKMEN, 2001).

Os resíduos e/ou subprodutos agroindustriais têm uma elevada concentração de nutrientes e podem ser utilizados no meio de cultura para o crescimento de micro-organismos e produção de lipases. Autores relatam a redução dos custos de produção aliada ao substrato (DE MORAIS *et al.*, 2016; SALIHU *et al.*, 2012; TREICHEL *et al.*, 2010). Além disso, a utilização de tais resíduos é uma maneira de aumentar a aplicação destes materiais que apresentam riscos ao ambiente (SALIHU *et al.*, 2012). Neste contexto, três resíduos agroindustriais foram avaliados, melaço, milhocina e águas residuais da produção de azeite. O melaço é uma fonte de carbono importante para os micro-organismos. Em seus trabalhos, POTUMARTHI *et al.* (2008) e CAVALCANTI *et al.* (2005) utilizaram o melaço, em conjunto com outros nutrientes, para formular um meio de cultura adequado à produção de lipase. A milhocina é comumente empregada como fonte de nitrogênio (5 g/L de proteína). SANTOS *et al.* (2013) e MALDONADO *et al.* (2014), por exemplo, utilizaram milhocina para produção de biossurfactantes e lipases, respectivamente. Já as águas residuais da produção de azeite são adequadas para produção de lipases, porque possuem frações do rejeito de azeite que induzem a produção desta enzima (D'ANNIBALE *et al.*, 2006; LOTTI *et al.*, 1998). ABRUNHOSA *et al.* (2013) e GONÇALVES *et al.* (2012) utilizaram esse resíduo nos meios de cultivos para produção da enzima lipolítica.

A produção de lipases por cultivo submerso utilizando resíduos (melaço, milhocina e OMW) na formulação do meio de cultivo é a inovação deste trabalho, até mesmo para uma levedura padrão, que é o caso da *C. rugosa*, uma vez que são meios de cultivos alternativos que barateiam o custo da produção desta enzima. Em dias atuais se faz necessário a diminuição dos custos de obtenção das enzimas, deixando-os mais atrativos para qualquer processo industrial (PINHEIRO *et al.*, 2008; SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003).

Este trabalho mostra os resultados da utilização dessas leveduras para produção de lipase, comparada com a produção de lipase produzida por outra levedura conhecida, a *C.*

rugosa fornecida por banco de cultura NRRL (*the Agricultural Research Service - United States Department of Agriculture*). Primeiramente foram testados meios de cultura sintéticos, em seguida meios alternativos para *C. rugosa* e, posteriormente, para as leveduras isoladas *C. tropicalis* e *M. caribbica*. Foi feito também o uso no biorreator em tipo tanque agitado para *C. tropicalis* e *C. rugosa*. As duas cepas apresentaram resultados positivos e são fontes propícias em aplicações industriais para produção da enzima.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

As lipases constituem uma classe de enzimas das mais utilizadas em biotecnologia (RIBEIRO *et al.*, 2011; SCHMID *et al.*, 1998). Essas enzimas estão sendo exploradas em processos biocatalíticos em diversas áreas, como na síntese de óleo-química, em alimentos, síntese de orgânicos e na indústria farmacêutica (SHARMA *et al.*, 2013; KAPOOR e GUPTA 2012; BASSEGODA *et al.*, 2012; TREICHEL *et al.*, 2010).

Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de ligações de éster-carboxílicos liberando ácidos carboxílicos e alcoóis. Em condições reacionais que envolvem pouca disponibilidade de água, elas atuam nas reações de esterificação ou de transesterificação (DAIHA *et al.*, 2015, SHARMA *et al.*, 2001, KOSKINEN *et al.*, 1996).

As enzimas lipolíticas microbianas catalisam uma grande variedade de reações e possuem alta especificidade de substrato, por isso são muito utilizadas industrialmente (AKSHATHA *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2011, HASAN *et al.*, 2009). As lipases microbianas são produzidas preferivelmente em fermentações submersas (MESSIAS *et al.*, 2011; FEITOSA *et al.*, 2009). As lipases são produzidas por várias bactérias, leveduras e fungos (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2007; HASAN *et al.*, 2006).

2.2 Micro-organismos produtores de lipases

As lipases são abundantes em animais, plantas e micro-organismos (KAPOOR e GUPTA, 2012; LIN *et al.*, 2006). As enzimas produzidas por via microbiológica apresentam algumas vantagens em relação as enzimas produzidas por plantas e animais, tais como, maior variedade de atividades catalíticas disponíveis, níveis elevados de conversão na síntese e na transesterificação de triacilgliceróis. A facilidade de manipulação genética, fornecimento regular uma vez que não sofrem flutuações sazonais. Além disso, os micro-organismos apresentam crescimento mais rápido quando comparados a plantas e animais, e é possível empregar meios de produção menos dispendiosos (HASAN *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2005; WISEMAN, 1995).

Alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* e *Yarrowia*. (GONÇALVES, *et al.*, 2007; HADEBALL, 1991). A maioria dos estudos de levedura para produção de lipase são com as espécies *C.*

rugosa e *Candida antartica*, existem outras leveduras crescentes nessa produção mostrando novos potenciais na área da biotecnologia (BUSSAMARA *et al.*, 2010; CIAFARDINI *et al.*, 2006; FERNANDEZ *et al.*, 2006). Muitos micro-organismos estão sendo estudados para a produção de lipases, a Tabela 1 mostra algumas dessas pesquisas.

Tabela 1 – Levantamento de micro-organismos produtores de lipase ao longo dos anos

Micro-organismos	Referência
<i>Fusarium globulosum</i>	GULATI <i>et al.</i> , 2005
<i>Antrodia cinnamomea</i>	LIN; WANG; SUNG, 2006
<i>Burkholderia cepacia</i>	FERNANDES <i>et al.</i> , 2007
<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2.3	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida cylindracea</i>	BROZZOLI <i>et al.</i> , 2009
<i>Aspergillus niger</i>	EDWINOLIVER <i>et al.</i> , 2010
<i>C. rugosa</i> NRRL Y-17506	MALDONADO <i>et al.</i> , 2012
<i>Geotrichum candidum</i>	FARIAS <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida antartica</i>	FERNANDES <i>et al.</i> , 2014
<i>C. rugosa</i>	DE MORAIS <i>et al.</i> , 2016

O trabalho desenvolvido nesta tese apresenta uma proposta de produção de lipases a partir das cepas *Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica* para entender mais sobre o processo fermentativo de produção e a caracterização das proteínas produzidas. Esses estudos são importantes, porque visam o desenvolvimento de um produto com potencial biotecnológico.

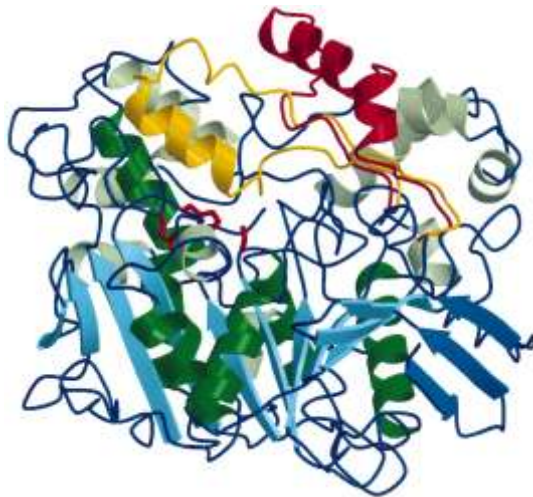
2.2.1 *C. rugosa*

A levedura *C. rugosa* é uma das leveduras mais aplicadas na indústria para produção da lipase e está sendo estudada há muito tempo devido sua capacidade de produção de lipases. Essa enzima possui alta atividade nas reações de hidrólise total ou parcial do triacilglicerol (VAKHLU; KOUR., 2006; REDONDO *et al.*, 1995), bem como nas reações de síntese e transesterificação de ésteres (MUSTRANTA, 1992, REDONDO *et al.*, 1995) o que favorece sua aplicação em muitos processos.

2.2.1.1 Lipase produzida por *C. rugosa*

Do ponto de vista estrutural e bioquímico, a *C. rugosa* expressa 5 genes já totalmente caracterizados e denominadas como isoenzimas (Lip1-Lip5) que se diferenciam nas posições de conformação e sítio ativo. Todas as isoenzimas apresentam uma estrutura de hidrolase α/β (OLLIS *et al.*, 1992), com uma tríade catalítica e uma conformação que cobre o sítio ativo quando a enzima está na sua forma inativa (DE MARIA *et al.*, 2006; AKOH *et al.*, 2004; FERRER *et al.*, 2001; CYGLER AND SCHRAG, 1999; BENJAMIN E PANDEY, 1998). A lipase de *C. rugosa* possui um sítio ativo formado por uma tríade catalítica (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama estrutural da lipase de *C. rugosa* em momentos aberto e fechado da conformação polipeptídica. A conformação fechada está representada na cor amarela, enquanto a conformação aberta está destacada em vermelho. Os resíduos que formam a tríade catalítica são mostrados em vermelho.



Fonte: Esta estrutura foi produzida usando MOLSCRIPT e Raster3D (CYGLER; SCHRAG, 1999).

A tríade catalítica é composta pelos resíduos serina (Ser184), histidina (His366) e aspartato (Asp334), ou glutamato (Glu341) Ser-His-Asp/Glu, o qual opera pelo mesmo mecanismo característico das 10 serinas hidrolases, incluindo algumas proteases, sendo semelhante tanto para as reações de hidrólise quanto para as reações de síntese (JAEGER e REETZ, 1998). O domínio que cobre o local do sítio ativo (conformação) pode ser constituído por uma única hélice, duas hélices ou uma região em *loop* (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.2.2. *Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica*

As duas cepas utilizadas neste trabalho foram a *C. tropicalis* e *M. caribbica*, isoladas do bagaço de caju; resíduo da exploração da cultura do caju (*Anacardium occidentale* L), que é uma das atividades agroindustriais mais importante do Nordeste brasileiro (PINHEIRO, 2015).

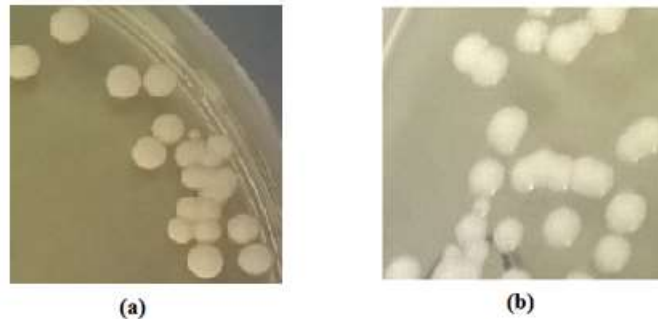
Essas leveduras, embora já mencionadas na literatura como fontes promissoras para a produção de lipases, foram pouco exploradas tecnicamente. Alguns autores citam a *C. tropicalis* como produtora de lipase (GUPTA *et al.*, 2015; TREICHEL *et al.*, 2010; VAKHLU; KOUR, 2006). A *M. caribbica* tem características parecidas com a *C. guilliermondii* (uma vez que essa levedura foi reclassificada pela Micoteca - URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para *M. caribbica*), pois essa já foi citada em trabalhos na produção de lipase (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Alguns artigos mostram a aplicação da *M. caribbica* sobre a capacidade antagonista da estirpe contra fungos diferentes que causam doenças em frutos, por exemplo, na ação antifúngica produzida pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (BAUTISTA-ROSALES *et al.*, 2013).

As leveduras *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* são também utilizadas em fermentações na indústria de alimentos por se tratar de micro-organismos benéficos a saúde. É comprovada a eficácia dessas leveduras, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, na conversão de xilose (ZHANG *et al.*, 2016, DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2014) e do hidrolisado hemicelulósico (DELGENES *et al.*, 1998), respectivamente, a xilitol. Essas leveduras também são apontadas como micro-organismos oleaginosos pela capacidade de acumular lipídios através de sua biomassa (DEY e MAITI, 2013 GUO e OTA, 2000; GUO *et al.*, 1999).

A foto dessas leveduras crescidas em placas estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – As leveduras *Candida tropicalis* (a) e *Meyerozyma caribbica* (b) cultivadas por placas em meio *Ágar Sabouraud* (AS).



Fonte: Autoria própria (2017).

2.3 Fatores que influenciam a produção das lipases

2.3.1 Cultivos microbianos

Os cultivos microbianos são realizados por meio de dois tipos básicos de processos de fermentação: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). O cultivo submerso facilita a produção em grande escala, pois garante a homogeneidade do meio, apresenta simples monitoramento e controle do processo (SILVEIRA *et al.*, 2016; CAPUTO 2012; COUTO e SANROMÁN, 2006). O cultivo em estado sólido geralmente apresenta baixo custo, dado o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e favorece menor risco de contaminação no processo (MESSIAS *et al.*, 2011). As enzimas industriais são produzidas basicamente através do bioprocessamento submerso por cultivos em batelada e batelada alimentada (COLLA *et al.*, 2013). Entretanto, os fungos filamentosos possam apresentar maiores produtividades através do processo de fermentação em estado sólido (COLLA *et al.*, 2013; GONZALEZ *et al.*, 2003).

Para determinar qual tipo de fermentação utilizar, se faz necessário uma avaliação sobre o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano (BARBOSA *et al.*, 2011). No caso de resíduos que apresentam grande quantidade de água para produção de enzimas, a fermentação submersa é a mais adequada (LIMA *et al.*, 2001).

Existem na literatura muitos estudos de produção de lipases através da fermentação submersa. Em De Moraes *et al.* (2016) a lipase foi produzida por *C. rugosa* e

Geotrichum candidum. Em Pinheiro et al. (2008) foi produzida a partir do micro-organismo *Penicillium verrucosum*, em Abrunhosa et al. (2013) a enzima foi produzida a partir de *Aspergillus ibericus*. Em Vakhlu, J.; Kour, A. (2006) estudou-se a produção por *C. tropicalis*. Em Rajendran et al. (2008) foi estudado a partir da levedura *C. rugosa*.

2.3.2 Meios de culturas e condições

A composição e as condições do meio de cultura são pontos relevantes na produção de enzimas (GRBAVCIC *et al.*, 2011). A síntese da lipase no meio de cultivo é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura de crescimento, e pela concentração de oxigênio dissolvido, quando o processo é submerso, e a concentração de indutores (COLLA *et al.*, 2013; VOLPATO, 2009; GUPTA *et al.*, 2004). Os indutores são substratos hidrofóbicos como ácidos graxos, triglicerídeos e alguns ésteres que promovem a produção da lipase (BRÍGIDA *et al.*, 2014; MARIMUTHU, 2013; FICKERS *et al.*, 2011; FICKERS *et al.*, 2005). A literatura apresenta diversos trabalhos sobre a produção da lipase (Tabela 2) com utilização de meios sintéticos e em meios com resíduos.

Tabela 2 – Principais substratos utilizados em meios de cultivos para produção de lipase

Micro-organismos	Substratos	Referência
<i>Candida sp. 99-125</i>	Óleo e a farinha de soja	HE e TAN <i>et al.</i> , 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i> NRRL Y-2178	Glicerol, glicose, extrato de levedura e peptona	LEE <i>et al.</i> , 2007
<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2.3	Azeite, glicose, sulfato de amônio	LIU <i>et al.</i> , 2008
<i>Candida cylindracea</i> NRRL Y- 17506	Tween e azeite	KASTRANOV <i>et al.</i> , 2008
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Torta de babaçu (rejeito da produção do óleo do babaçu) suplementado com melação	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus pumilus</i> RK 31	Azeite de oliva e Tween 80	KUMAR <i>et al.</i> , 2011

<i>Yarrowia lipolytica</i> (estirpe CBS6303 com mutação)	Tributirina, glicose, glicerol, ácido cítrico, peptona	FICKERS <i>et al.</i> , 2011
<i>C. rugosa</i> CBS 2275	Extrato de levedura peptona, glicose e OMW	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2012
<i>Geotrichum candidum</i> NRRLY-552	Milhocina e óleo de soja	MALDONADO <i>et al.</i> , 2014
<i>Candida viswanathii</i>	Ácido cítrico, vitaminas e solução salina	FABISZEWSKA <i>et al.</i> , 2015

O carbono é componente fundamental da célula. A fonte de carbono é um dos fatores mais importantes que influenciam a produção de lipase (CAPUTO *et al.*, 2012, WEI *et al.*, 2004), sendo essencial na biossíntese enzimática podendo estimular ou inibir sua produção (DALMAU *et al.*, 1998). As gorduras, óleos naturais, ácidos graxos, óleos vegetais, triglicerídeos, detergentes à base de ésteres são utilizados como fontes de carbono e indutores da produção de lipase (TAN *et al.*, 2003; HIOL *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 1999).

O nitrogênio é um elemento encontrado na natureza tanto na forma orgânica quanto inorgânica. Fontes de nitrogênio orgânico (FADILOGLU AND ERKMEN, 2001) e inorgânico (RIGO *et al.*, 2009; PALMA *et al.*, 2000), têm um papel muito importante na síntese da enzima (TAN *et al.*, 2003). Diferentes formas de nitrogênio orgânico e inorgânico tem sido utilizado na produção de lipases, especialmente extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e uréia (KUMAR *et al.*, 2005; FERRER *et al.*, 2001).

Os micro-organismos podem produzir diferentes tipos de lipase de acordo com as condições de cultivo, e a enzima produzida possui relações diferentes quanto à especificidade dos substratos (GONÇALVES *et al.*, 2007).

2.3.3 Resíduos agroindustriais

Os meios de culturas contendo resíduos agrícolas representam recursos potenciais para uso na biotecnologia, pois possuem baixo custo e composições com abundantes nutrientes e minerais, além de serem fontes de carbono e nitrogênio (SALIHU *et al.*, 2012; MUSSATTO, 2009; GRAMINHA *et al.*, 2008; PANDEY *et al.*, 2000).

A utilização desses resíduos alternativos possibilita a redução da poluição, pois diminuem a disposição dos mesmos ao ambiente (TREICHEL *et al.*, 2010). Com o uso dos resíduos surge-se o termo "Clean technology". É a técnica de aproveitamento dos materiais que apresentam ameaça ao meio ambiente e são ordenadamente utilizados para trazer a produtividade dos recursos necessários para fazer a atividade humana sustentável (SALIHU *et al.*, 2012).

O emprego das enzimas lipases em escala industrial ainda é pequeno, embora exista uma ampla quantidade de lipase produzidas por micro-organismos, devido aos elevados custos do processo de produção (DE MORAIS *et al.*, 2016; JUNQUEIRA, 2014). O uso de substratos alternativos como meios de cultivo barateia o processo de obtenção dessas enzimas (SALIHU *et al.*, 2012; TREICHEL *et al.*, 2010).

O melaço, um subproduto do processo de fabricação de açúcar de cana, foi validado como uma matéria-prima econômica para a produção de vários produtos biotecnológicos, um dos mais aplicados na atualidade é a produção de etanol. O melaço ainda é aplicado como aditivo para nutrição animal (SHARMA *et al.*, 2016; GNANSOUNOU *et al.*, 2015; DASGUPTA *et al.*, 2014). Ele contém uma elevada concentração de carboidratos (cerca de 50%), bem como outros compostos de valor agregado, tais como vitaminas (GUDIÑA *et al.*, 2015).

A milhocina é um subproduto líquido gerado pela indústria de moagem úmida do milho. É rico em vitaminas, minerais, aminoácidos e proteínas, sendo uma importante fonte de nitrogênio para muitos processos biotecnológicos (GUDIÑA *et al.*, 2015; HENKEL *et al.*, 2012; MADDIPATI *et al.*, 2011).

No processo de produção de azeite, é necessário a adição de água quente ao processo, o que gera a produção de grandes quantidades de resíduos líquidos conhecidos como águas residual da produção do azeite (OMW - olive mill wastewater), o que é considerado uma significativa fonte de resíduos agroindustrial (ABRUNHOSA *et al.*, 2013). Os principais componentes do OMW, além da água (83% a 94%), são lipídios, carboidratos,

compostos fenólicos, ácidos orgânicos, taninos, pectinas e minerais (GUDIÑA *et al.*, 2016). Muitos micro-organismos, tais como *Candida cylindracea* (D'ANNIBALE *et al.*, 2006; LOTTI *et al.*, 1998), *Yarrowia lipolytica* (D'ANNIBALE *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2009), *Geotrichum candidum* (ASSES *et al.*, 2009) e outros fungos (D'ANNIBALE *et al.*, 2006) tiveram um bom desempenho na produção de lipase a partir de meio de cultura contendo OMW (ABRUNHOSA *et al.*, 2013).

2.4 Aplicação das lipases

As lipases são empregadas em várias indústrias como na formulação de detergentes, na indústria oleoquímica, biocombustíveis, alimentos, laticínios, agroquímicos, fabricação de papel, nutrição, cosméticos, produtos farmacêuticos e tratamento de esgoto (GUPTA *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2013; SALIHU *et al.*, 2011; SHARMA *et al.*, 2001). A variedade de aplicações das lipases tem impulsionado novas pesquisas como foco na produção dessas enzimas (GUPTA *et al.*, 2015).

A Tabela 3 mostra algumas aplicações industriais das lipases. Essas aplicações foram mais detalhadas nos itens a seguir.

2.4.1 Alimentos

Essas enzimas são também utilizadas na produção de aditivos em alimentos, que nada mais são que ésteres produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia curta que atuam na modificação do sabor (COLLA *et al.*, 2013; BURKERT *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2001). Em alimentos, como o queijo, as lipases participam na formação de ácidos graxos livres que são constituintes principais para o sabor do queijo (BERTRAM *et al.*, 2008; PERRY 2004).

Tabela 3 – Aplicação industrial das lipases

Área Industrial	Aplicação	Produto
Alimentação	Hidrólise de gordura de leite	Aromas para produtos matinais
	Síntese de ésteres	Aromas para alimentos e bebidas
Química	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos
	Remoção de gorduras	Detergente para lavanderias ou uso doméstico
	Síntese de ésteres	Ésteres, emulsificantes
Alimentação/ química/ farmacêutica	Transesterificação de óleos naturais	Óleos e gorduras (análogo de manteiga de cacau)
Cosméticos	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes

Fonte : Paques e Macedo, 2006.

2.4.2Oleoquímica

As lipases atuam no aumento do valor nutritivo de óleos e gorduras, fazendo com que as estruturas dos triacilgliceróis sejam modificadas, alterando as suas propriedades físico-químicas, transformando-os em produtos de alto valor agregado. A transesterificação catalisada por lipase de óleos mais baratos pode ser utilizada, por exemplo, para produzir manteiga de cacau a partir do óleo de palma. Atuam também na interesterificação de gorduras sólidas não hidrogenadas e síntese de triacilglicerídeos saturados (GUPTA *et al.*, 2015; KAPOOR *et al.*, 2012; HASAN *et al.*, 2006).

2.4.3 Detergentes

As lipases são também utilizadas como aditivos na fabricação de detergentes para melhorar a capacidade de lavagem e facilitar na remoção de gorduras (GRBAVC`IC' *et al.*, 2011; JURADO *et al.*, 2007; SAEKI *et al.*, 2007; GAUR *et al.*, 2008). Uma das principais vantagens do uso de lipase em detergentes é na retirada dos polissulfatos transformando-os em produtos biodegradáveis o que reduz os impactos ambientais (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

2.4.4 Química/farmacêutica

Os principais intermediários na síntese de agentes terapêuticos, agroquímicos e compostos aromatizantes são normalmente complexos e/ou compostos quirais, que são difíceis de sintetizar com métodos químicos, as enzimas lipases auxiliam na aplicação dessas sínteses (JAEGER e EGGERT, 2002). As lipases possuem elevadas enantioseletividade (OLIVEIRA *et al.*, 2014; BUSSAMARA *et al.*, 2010; GUPTA *et al.*, 2007; HERNANDEZ-RODRIGUES *et al.*, 2009). Essa propriedade possibilita a utilização em biocatalisadores preparados não tóxicos e, portanto, ideais para aplicação na liberação de fármacos e em alimentos (MENDES *et al.*, 2011).

2.5 Atividade lipolítica

São várias as metodologias utilizadas para se determinar a atividade hidrolítica de lipases (BRÍGIDA *et al.*, 2010; TSUJITA *et al.*, 1984; GELUK *et al.*, 1992; MARTINELLE; HULT, 1995; PENCREAC`H e BARATTI, 1996; SECUNDO e CARREA, 2001. Os ensaios enzimáticos são muito utilizados para determinação da atividade. Os métodos mais recorrentes são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de p-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprilato, palmitato e esterato). O uso de substratos solúveis em água, tais como p-nitrofenil palmitato (pNFP) (TREVISAN *et al.*, 2004; MAHADIK *et al.*, 2002), esses apresentam algumas vantagens, devido ao seu curto tempo de reação e simples leitura através de espectrofotometria. No entanto, esses substratos não são os mais adequados para determinar a atividade da lipase de verdade, porque eles são também hidrolisados por esterases (ERDMANN *et al.*, 1990).

Os métodos titulométricos são empregados também amplamente para a determinação de atividade da lipase (VEERARAGAVAN, 1990). Esses fundamentam-se na titulação alcalina dos íons de hidrogênio liberados na dissociação dos ácidos graxos, resultantes da ação das lipases sobre as moléculas do triglicerídeo (WATANABE *et al.*, 1977; LINFIELD *et al.*, 1985).

Na mistura de reação o triglicerídeo é adicionado sob a forma de emulsão e seu preparo requer a adição de agentes emulsificantes ou estabilizantes de emulsão. Em geral usa-se a goma arábica como agente estabilizante sem a necessidade de adição de agentes tensoativos (COLEN *et al.*, 2006; HOPPE; THEIMER, 1995). Por outro lado, as emulsões de óleo de oliva, preparadas com solução de álcool polivinílico, conservam-se completamente homogêneas durante o ensaio e podem ser usadas na determinação da atividade lipásica (COLEN *et al.*, 2006; WATANABE *et al.*, 1977).

2.6 Métodos de extração

Diferentes métodos podem ser empregados para extração de proteínas intracelulares. Métodos mecânicos, físicos, químicos, enzimáticos e a combinação destes podem ser aplicados (PANDIT, 2005; VAN HEE *et al.*, 2004). Uma das formas de se recuperar materiais intracelulares é utilizando ultrassom através da sonicação que promove a ruptura da célula por cavitação (PILLI *et al.*, 2011; KAPUCU *et al.*, 2000; OZBEK; ULGEN, 2000).

Para a produção de lipase em Kapturowska *et al.* (2012) foi utilizada a sonicação das células para liberação da enzima a partir da levedura *Yarrowia lipolytica*, os melhores resultados para atividade de lipase foram na potência de 30 e 90 W durante 15 min de sonicação. Em Dominguez *et al.*, 2005 a produção de lipase a partir de *Thermus thermophilus* a suspensão celular foi sonicada em dois ciclos de 2 min e 50% da potência máxima. Apesar desse método estar sendo muito utilizado, o ultrassom danifica ou remove a parede celular liberando uma enorme quantidade de conteúdo ao meio contendo a enzima (WU *et al.*, 2014).

2.7 Purificação de lipases

O processo de purificação é relevante na obtenção da enzima e sua aplicação industrial. Independentemente da fonte de lipase ou da técnica empregada, a purificação pode ser medida por um aumento da atividade específica, porém limitada (GUPTA *et al.*, 2004).

De forma geral, as enzimas podem ser purificadas por etapa única, no caso da cromatografia de afinidade ou por uma combinação de várias etapas, por exemplo, precipitação de proteínas, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, etc (BARBOSA *et al.*, 2011).

A precipitação de proteínas é uma técnica de purificação parcial considerada rápida e eficiente, sendo empregada para eliminar interferentes do processo e aumentar a atividade específica da enzima. Ela consiste na separação das proteínas de outras substâncias presentes no extrato (HEIDTMANN *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2008). Muitos artigos utilizam a purificação parcial de lipase através da precipitação de sais (BORKAR *et al.*, 2009; ABBAS *et al.*, 2002 e KUMAR *et al.*, 2005).

O método de purificação utilizando adsorção hidrofóbica, é muito utilizado, se mostra eficiente na purificação de enzimas e se torna muito conhecida devido a vantagem de imobilização, entre outros benefícios inerentes na maioria das lipases (VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017, BARBOSA, *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2009). Para a dessorção da enzima nos suportes, normalmente são utilizados detergentes (RUEDA *et al.*, 2015). Dentre os adsorventes hidrofóbicos mais utilizados são dos grupos fenil e octil (VOLPATO, 2009).

Vários trabalhos na literatura citam a utilização de lipases adsorvidas em suportes octil-agarose (PEIRCE *et al.*, 2016, MANOEL *et al.*, 2015; BRANCO *et al.*, 2015, FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2007, BASTIDA *et al.*, 1998).

2.8 Biorreatores

As fermentações de enzimas microbianas são afetadas por variáveis como temperatura, agitação e volume do inóculo quando executadas em escalas de bancadas (cultivo em frascos), já na ampliação da escala para biorreatores tem se inúmeros outros fatores envolvidos como configuração do rotor, distância do impulsor ao fundo do biorreator, taxa de altura contra temperatura (H/T), além de fatores físicos como pressão e distribuição dos substratos ao meio são pontos importantes (PUTHLI *et al.*, 2006; JAEGER *et al.*, 1994)

Nos frascos, o cultivo pode apresentar uma série de dificuldades experimentais, sendo a agitação uma alternativa preferível para manter o oxigênio na concentração adequada para a levedura (PUTHLI *et al.*, 2006; BUCHS, 2001; CALAM, 1986). A utilização de agitação mecânica nos biorreatores ajuda a fornecer uma área interfacial adequada e uma melhor transferência de massa na hidrólise dos lipídios (ROONEY; WEATHERLEY, 2001).

A literatura apresenta trabalhos utilizando biorreatores na produção de lipase. Noor *et al.* (2006) produziu lipase por *Candida cylindracea* DSMZ 2031 em biorreator utilizando meios de cultura com vários óleos como fonte de carbono, o óleo de palma apresentou maior produção da enzima. Em Zhao *et al.* (2008) estudaram a produção de lipase recombinante obtida a partir de *C. rugosa* expressa em *Pichia pastoris*, mostrando que o alto nível de proteínas produzidas diferente da lipase, limitou reações metabólicas e também forneceu uma densidade alta de biomassa afetando o oxigênio dissolvido ao meio (ZHANG *et al.*, 2005; SCHMIDT, 2005; MATTANOVICH *et al.*, 2004). Em Bussamara *et al.* (2010) a lipase foi produzida por leveduras isoladas de uma planta através do cultivo em frascos e em biorreator, mostrando que o aumento de escala promoveu um aumento na produção da enzima. Em Oliveira *et al.* (2014) estudaram a produção de lipase a partir *Candida guilliermondii* por cultivos em frascos e em biorreator de 14 L, com aeração e sem agitação mecânica, obtendo resultados parecidos para ambos os processos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho consiste em avaliar a produção de lipases por duas leveduras isoladas do bagaço de caju (*Candida tropicalis* e *Meyerozyma caribbica*) e depois, avaliar o impacto da utilização de resíduos na produção de lipases por estes microorganismos. Em seguida, fazer o estudo da sua produção em biorreator, para possíveis aplicações em escala industrial.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliação de duas leveduras isoladas do bagaço de caju para a produção de lipase (extracelular e intracelular) por cultivo submerso;
- ✓ Produção de lipase por uma cepa de referência, *C. rugosa* NRRL Y-95;
- ✓ Avaliação de meios alternativos contendo melaço, milhocina e águas residuais da produção de azeite, como fonte de nutrientes, em escala de bancada;
- ✓ Caracterização bioquímica das lipases produzidas;
- ✓ Avaliação da produção das lipases por *C. rugosa* NRRL Y-95 e *Candida tropicalis*, em Reator batelada 1L.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

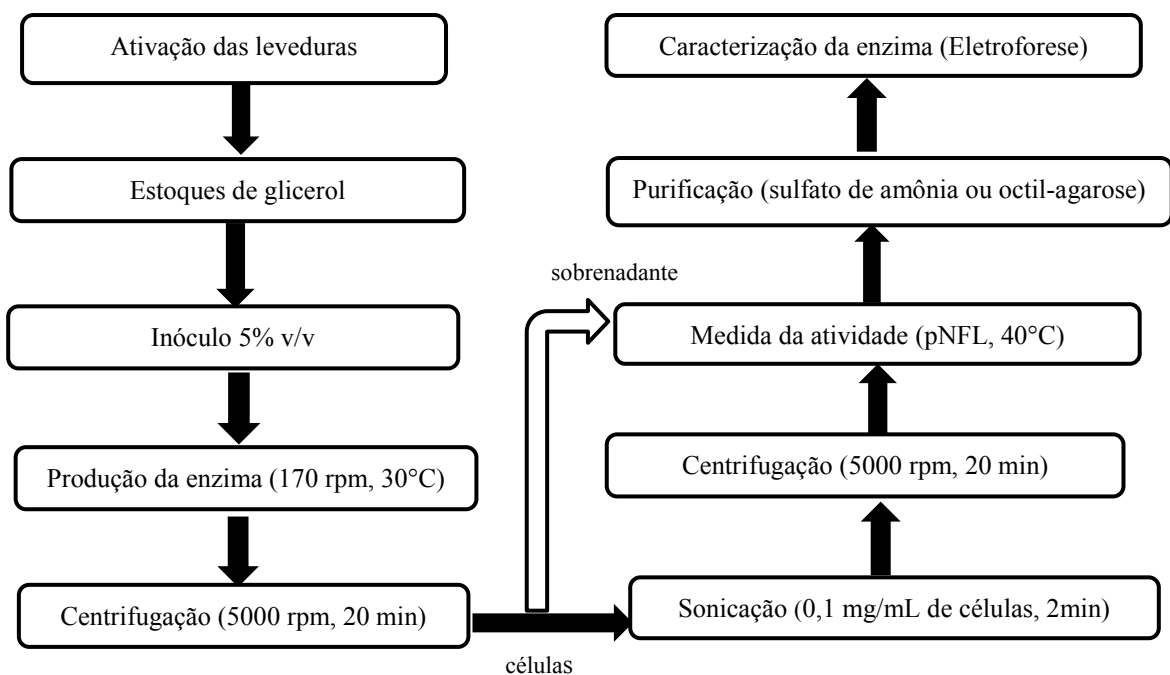
A cepa de *C. rugosa* NRRL Y-95, pertencente à coleção de cultura da ARS (Agricultural Research Service), foi doada pelo *United States Department of Agriculture* (USDA). *Meyerozyma caribbica* LABIOTEC 4 (antes classificada pela Micoteca - URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como *Candida guilliermondii*) e *Candida tropicalis* URM 7057 foram gentilmente cedidas pelo LABIOTEC.

Todas as culturas foram ativadas em meios contendo *ágar sabouroud dextrose* (SIGMA) a 30°C por 48 h. Foram feitos repiques em meios contendo 40 g/L de glicose e 10 g/L de peptona e as culturas foram armazenadas em tubo de glicerol (30% v/v), em freezer criogênico a -80 °C.

4.2 Produção da enzima

A lipase foi produzida pelas leveduras *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica* através de todas as etapas constadas no Fluxograma da Figura 3.

Figura 3- Fluxograma das etapas de cultivo e purificação parcial da produção de lipases.



4.2.1 Propagação do inóculo

O cultivo submerso foi conduzido em frascos de 250 mL, contendo 50 mL de meio, a 30 °C e 170 rpm por 20 horas (*C. rugosa*), 24 horas (*C. tropicalis*) e 36 h (*M. caribbica*). O meio de propagação do inóculo continha: 10 g/L de glicose, 10 g/L peptona, 4 g/L de extrato de levedura e 0.5 % de ácido oleico em tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 7,0.

4.2.2 Meio sintético com adição de vitaminas para produção de lipases por *C. rugosa* e *C. tropicalis*

Primeiramente foi testado um meio sintético com vitaminas (BENJAMIN e PANDEY (1995) para *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica*. Composição (g/L): glicose 10, peptona 5, extrato de malte 3, extrato de levedura 3, CaCl₂.2H₂O 0,5, K₂HPO₄ 0,4, KH₂HPO₄ 0,24, (NH₄)₂SO₄ 1,6, MgSO₄.7H₂O 0,5, Tween 0,3% e 10% ácido oleico, vitaminas: 2 mg/L de biotina, 2 g/L de inositol e 0,4 g/L de tiamina (BEJANMIM; PANDEY, 1995; DALMAU *et al.*, 2000).

4.2.3 Meio sintético para produção de lipases por *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica*

Nesta etapa foram testados meios sintéticos para a produção da lipase, contendo ou não fontes de carbono e nitrogênio alternativas. O meio de cultura sintético testado está apresentado na Tabela 4 e as 4 fontes alternativas (as quantidades utilizadas de cada resíduo, na composição dos meios, foi relacionada com a quantidade de cada substrato sintético do meio (C), apresentadas na Tabela 5. As altas quantidades de extrato de levedura utilizadas no meio A e B visaram garantir excesso de nutrientes como uma tentativa de produção da enzima, devido a dificuldades reportadas na literatura quando se utilizam meios que não contenham vitaminas (TAKAÇ *et al.*, 2010; 2003, MONTESINOS *et al.*, 2003, DALMAU *et al.*, 2000).

Tabela 4 – Composição do meio sintético

Componentes	Meio de cultura		
	A (g/L)	B (g/L)	C (g/L)
Glicose	1	10	20
NaNO ₃		1	-
Peptona	-	-	3
KH ₂ PO ₄	1	1	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	0,5	0,5
Extrato de levedura	70	70	4
Ácido oleico (v/v)	3%	3%	1%

4.2.4 Meio com resíduos para produção de lipases por *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica*

Os meios de cultura foram determinados conforme a Tabela 5. Foi ainda calculada uma quantidade superior do volume total, porque ocorre um precipitado em torno de 5% desse volume proveniente da milhocina. Utilizou-se a centrífuga a 5.000 rpm por 15 min para a retirada do precipitado.

Tabela 5 – Composições do meio de cultura contendo meios alternativos, resíduos agroindustriais, para produção de lipase por *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica*

Nutrientes	Carbono (5 g/L açúcar redutor)	Nitrogênio (4 g/L)	Indutor 1 % (v/v)
Meio sintético	Glicose	Extrato de levedura	Ácido oleico
Meio 1	Melaço	Extrato de levedura	Óleo de oliva
Meio 2	Glicose	milhocina	Óleo de oliva
Meio 3	Glicose	Extrato de levedura	OMW
Meio 4	Melaço	milhocina	OMW

4.2.5 Esterilização

Todos os componentes utilizados no cultivo foram esterilizados a uma pressão de 1,0 atm, a 121°C, por 21 min, sendo o meio de cultura esterilizado a 0,5 atm de pressão, a 110°C, durante 15 min, numa autoclave.

4.3 Definição da reação modelo para a determinação da medida de atividade enzimática

Com a finalidade de se verificar o melhor substrato para medir a atividade, foram realizados testes de hidrólise dos substratos p-nitrofenil butirato (C4), p-nitrofenil laurato (C12) e p-nitrofenil palmitato (C16), utilizando a lipase extracelular produzida por *C. tropicalis*.

Para o preparo do substrato p-nitrofenil laurato (pNFL), foi utilizado o método descrito por Brígida (2010). Esse consiste em pesar 0,018 g de pNFL em 1 mL de dimetilsulfóxido (CH₆OS), dissolver em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, colocar em banho-maria a 37 °C. Em seguida, colocar 2,25 mL do substrato e 0,25 mL da enzima na cubeta (absorbância 410 nm) e deixar reagir por 1,5 min e fazer a leitura da absorbância no espectrofotômetro.

Para o substrato p-nitrofenil palmitato (pNFP), foi usada a metodologia proposta por Godoy et al. (2011), com modificações. O ensaio foi conduzido a temperatura de 37 °C/1,5min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm para esse substrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato enzimático, mais 0,25 mL de p-nitrofenil palmitato e 2,2 de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0.

Para o substrato p-nitrofenil butirato (pNFB), foi seguido o método de Gomes et al. (2011). Esse consistiu em tomar uma alíquota de 20 µL do sobrenadante centrifugado e adicioná-la a 980 µL de uma mistura de reação com a seguinte composição: pNPB 1,12 mM dissolvido em 50 mM de tampão fosfato, com pH 7,0, e 4% (v/v) de Triton X-100 nestas condições. A reação foi monitorada durante 15 min contra um branco. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de lipase necessária para liberar um µmol de p-nitrofenol, em um minuto, sob as condições especificadas.

4.4 Teste ultrassônico para rompimento das células

As células foram obtidas por centrifugação (5.000 rpm, por 20 min, a 4°C) e lavadas uma vez com 20 mL de água destilada. O sobrenadante foi separado e a atividade extracelular analisada. Depois, a massa de células foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7.0, a uma concentração de 0,1 mg/mL. Para o rompimento das células e liberação da enzima intracelular, utilizou-se ultrassom de ponteiros (Sonicator Qsonic), em tempos de 2 e 4 min, com pulsos de 30 segundos e 10 segundos de descanso, potência do equipamento de 500 watts e amplitude utilizada de 35%. Depois da ruptura, o extrato foi novamente centrifugado na rotação 5.000 rpm, por 10 min, a 30°C, retirou-se o sobrenadante para determinar a atividade enzimática.

4.5 Avaliação da influência da concentração da fonte de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *C. rugosa*

A influência da fonte de carbono e nitrogênio na produção de lipases por *C. rugosa* foi avaliada utilizando um planejamento fatorial fracionado (2^{3-1}), feito com 3 repetições no ponto central, em um total de 7 ensaios, apresentado na Tabela 6. As concentrações dos substratos no meio de cultura 4 utilizadas foram: melão (5 para 15 g/L), milhocina (2 para 6 g/L) e águas residuais da formação de azeite (0,5 para 1,5% v/v).

Tabela 6 – Produção de lipase por *C. rugosa* utilizando variações na concentração dos resíduos do meio número 4

Ensaio	Glicose (açúcar residual g/L)	OMW (g/L)	Milhocina (nitrogênio g/L)
1	5	0.5	6
2	15	0.5	2
3	5	1.5	2
4	15	1.5	6
5 (C)	10	1	4
6 (C)	10	1	4
7 (C)	10	1	4

4.6 Determinação da razão carbono-nitrogênio

Foi feito ainda ensaios mantendo a concentração de carbono (melaço e OMW) fixas e variou-se apenas as concentrações de nitrogênio através da milhocina (6, 8, 10, 12, 15 e 20 g/L). Com esses resultados e o do planejamento fatorial fracionado foi possível determinar empiricamente através de dados estequiométricos a massa de carbono e nitrogênio relacionados a massa molar de cada substância que estavam presentes. Foram utilizados dados na literatura do melaço (490 g/L de carboidratos e 85 g/L de glicose), milhocina (5 g/L de proteína e 75 g/L de carboidratos) (GUDIÑA *et al.*, 2015). O OMW contém em maior quantidade de ácidos graxos o ácido oleico (78,5%) e ácido palmítico (12%) (MENESES *et al.*, 2017). As densidades dessas substâncias pelas especificações da Sigma-Aldrich são 0,896 g/mL para o ácido oleico e 0,853 g/mL para o ácido palmítico.

4.7 Purificação parcial das enzimas produzidas

4.7.1 Por precipitação das proteínas

As proteínas presentes no meio de cultura foram precipitadas com sulfato de amônio sólido (70% de saturação) sob agitação contínua, e incubadas, a 4°C, durante 24 horas. Após esse período, a amostra foi centrifugada, durante 10 min, a 6.200 rpm. O precipitado resultante foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0 e ainda passou por um processo de dessalinização, utilizando-se uma coluna de Sephadex (GE-Healthcare). Antes da utilização da coluna foi executado todo um procedimento com a mesma, primeiro a coluna foi lavada com água purificada por 5 vezes, depois equilibrada por 5 vezes com o tampão da enzima. Só então em seguida que foi passado 1,0 mL do extrato, logo após a passagem do extrato foi passado novamente 2,1 mL do tampão da enzima e foi feito a coleta da amostra em tubos *eppendorf*.

4.7.2 Por interação hidrofóbica

A metodologia de purificação utilizada foi de GUTARRA *et al.* (2011) com adaptações. A enzima lipase foi extraída do extrato de *C. tropicalis* através do mecanismo de adsorção da enzima em octil-agarose por interação hidrofóbica e posterior dessorção da enzima em uma solução de Triton X-100 0,1% ou Triton X-100 1% (v/v em tampão fosfato

de potássio 5 mM, pH 7,0). Foi oferecida uma carga enzimática da lipase de 4,22 U/g no suporte de octil-agarose. A atividade inicial do extrato era 528 U/L e massa de agarose 0,5 g. Ainda em cada 3 mL de extrato foi adicionado 1 mL do tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0. A proporção de imobilização utilizada foi de 1:8 vezes.

O procedimento de adsorção foi feito colocando a massa de octil (lavada com água destilada e seca a vácuo) junto com o extrato enzimático em agitador rotatório por 24 horas. Depois foram retiradas alíquotas e centrifugadas nos tempos pré-estabelecido. O sobrenadante foi retirado e a atividade foi determinada conforme item (4.8.4). Depois do processo de adsorção, na tentativa de dessorção, esse derivado foi colocado em contato Triton X-100 0,1% (v/v em tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,0) e conduzido em agitador rotatório. O sobrenadante foi retirado e a medida da atividade conforme item (4.8.4) nos tempos de 24 em 24 horas nos primeiros dois dias e em 96 horas.

4.8 Métodos Analíticos

4.8.1 Medida de proteína

O teor total de proteína foi determinado pelo método de Bradford (1976). A albumina de soro bovino (BSA), na concentração de 1 mg/mL, foi usada como o padrão de proteína para a curva de calibração obtida a partir da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO).

4.8.2 Medida do açúcar residual

A concentração de açúcares redutores foi baseado no método de Miller utilizando o reagente de DNS (MILLER, 1959). A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução de glicose com concentrações de 0,2 g/L a 3 g/L. A metodologia consistiu em agitar 100 µL da solução do extrato mais 100 µL da solução de DNS. Em seguida a mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min e adicionada 1 mL de água destilada, resfriada em banho de gelo, depois foi medida a leitura da absorbância (540 nm) em um espectrofotômetro (Biochrom Libra S11).

4.8.3 Crescimento celular

Para se determinar a concentração de biomassa ao longo das fermentações, a absorbância foi medida a 600 nm, num espectrofotômetro Biochrom Libra S11. Uma curva de calibração foi usada para converter os valores de absorbância obtidos em concentrações de biomassa (g/L).

4.8.4 Atividade de lipase

A atividade da lipase extracelular e intracelular foi determinada usando-se o p-nitrofenil laurato como substrato. Os valores de absorbância foram determinados a 410 nm em um espectrofotômetro (Biochrom Libra S22). O substrato (pNFL) foi pesado (0,0090 g) e dissolvido em 0,5 ml de dimetilsulfóxido. Em seguida, misturado em 50 ml de fosfato de potássio tampão 50 mM a pH 7,0 e 37°C, conforme descrito por BRÍGIDA (2010). Depois, foram adicionados, na cubeta, 380 uL de substrato pronto, mais 50 uL do extrato enzimático, permitindo-lhe reagir durante 10 min a 40°C (método validado anteriormente com a enzima de *C. rugosa* comercial). Após este tempo, a reação foi parada pela adição de 800 uL de acetona (GOMES *et al.*,2011). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1,0 umol de p-nitrofenol por minuto, sob as condições de ensaio, a 37 °C.

4.8.5 Determinação da atividade de protease

A atividade da protease foi determinada utilizando azocaseína 2% (p/v) como substrato, com modificações, de acordo com a metodologia proposta por SANGORRÍN *et al.* (2000). Foi colocado 500 µL de substrato e adicionado 500 µL de amostra. A mistura foi incubada a 36,5 °C por 40 min. A reação foi parada adicionando 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Os tubos foram centrifugados (15 min/6.500 rpm) e 1 mL do sobrenadante obtido foi adicionado a 1 mL de solução KOH 5 M. O produto da reação foi medido em 428 nm, num espectrofotômetro Biochrom Libra S22. A solução branco foi realizada adicionando-se TCA 20% antes da adição da amostra. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

4.8.6 Preparo do inibidor de protease

As medidas de atividade proteolítica nos extratos foram determinadas antes, e depois de cada amostra ter sido colocado 1 mL de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) com a finalidade de inibição da atividade da protease no extrato.

O PMSF foi preparado dissolvendo-se 0,00147 g dessa substância em 100 μ L (0,1 mL) de dimetilsulfóxido e dilui-se a amostra de forma que, a cada 10 mL de extrato, contivessem 0,00147 g de PMSF (HERNÁNDEZ-MONTAÑEZ *et al.*, 2007).

4.9 Produção em biorreator

Após a produção de lipase por *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica* em frascos agitados, seguiu-se para produção em biorreator de 1 L. Em todos os ensaios, foram utilizados 750 mL de meio e um inóculo de 5% v/v (igual ao meio do cultivo), o pH foi controlado a 7,0 com NaOH 1,5 M. As fermentações foram conduzidas a 30° C, durante 48 horas ou 72 h a 300 rpm.

Para produção da lipase a partir de *C. tropicalis* foi utilizado inicialmente o meio sintético com a composição de glicose (5 g/L), extrato de levedura (6 g/L) e ácido oleico (0,5% v/v), além de sulfato de amônio (0,5 g /L) e peptona (3 g /L) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0.

Posteriormente, utilizou-se as leveduras *C. tropicalis* e *C. rugosa* em meio de cultura com resíduos previamente modificado constituído de melaço (5 g/L), milhocina (6 g/L), águas residuais da produção de azeite (0,5%), sulfato de amônio (0,5 g/L) e peptona (3 g/L), em 50 mM de tampão de fosfato de potássio a pH 7,0.

4.10 Caracterização da enzima

4.10.1 Temperatura e pH ótimos

Para determinar a temperatura e o pH ótimos, extratos (meio sintético para *C. rugosa* e meio com resíduos para *C. tropicalis*) contendo a enzima intracelular e extracelular foram obtidos por cultivo no tempo de 24 horas.

O substrato foi preparado em conformidade com o item 4.8.4 e a enzima foi incubada a 40°C, durante 10 min, sob diferentes valores de pH, que variaram de 4,0 a 9,0, utilizando-se tampões 50 mM, tampão de acetato de sódio, pH 4,0 - 5,0, tampão fosfato de potássio, pH 6,0 - 8,0, e tampão de bicarbonato de sódio, pH 9,0.

Quando se avaliou o efeito da temperatura, o substrato foi preparado em conformidade com o item 4.8.4, em 50 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e as enzimas incubada nas temperaturas de 30 a 70°C para *C. rugosa* e 30 a 80°C para *C. tropicalis*.

4.10.2 Eletroforese

O protocolo utilizado foi o de Laemmli (1970), com a concentração do gel de poliacrilamida de 12%, 1,25 mL (tampão de separação de 1,5 M de Tris-HCl a pH 8,8, mais 0,4% de dodecilsulfato de sódio, 2 mL de bisacrilamida a 30%, 25 uL de dodecilsulfato de sódio a 10% e 7 mL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenediamina). Inicialmente, a solução de enzima foi aquecida a 90°C, durante 5 min, e alíquotas de 12 mL de cada amostra foram aplicadas ao gel, que foi submetido a uma tensão de 150 volts (BioRad, USA). O tampão de ruptura foi preparado conforme metodologia de Garcia-Galan et al. (2014). O marcador BenchmarkTM foi utilizado como marcador padrão na eletroforese com peso molecular (MW) determinado pela comparação da mistura de proteínas (marcador molecular padrão de baixo peso – LMW) presente no primeiro poço. O LMW é contido de misturas de fosforilase (97 KDa), albumina (66KDa), ovalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e lactalbumina (14KDa). Para análise de comparação, foi posto no segundo poço uma alíquota contendo lipases comerciais. Após a eletroforese, foram feitos dois métodos de coloração do gel, no primeiro os géis foram corados com 0,25% de Azul Brillante de Cromassie R-250, em 45% de etanol/ácido acético 10%. No seguinte método, foi feita a coloração com o reagente nitrato de prata, conforme MORRISSEY (1981). As bandas do gel colorido em nitrato de prata foram analisadas no programa utilizando o software *Gelanalyzer* (LAZAR E LAZAR, 2010).

4.10.3 Zimograma

Para a realização do zimograma (eletroforese nativa), utilizou-se um gel preparado como descrito no item 4.8.2, em 12% de poliacrilamida, mas em ausência de SDS

no gel de SDS e β -mercaptoetanol no tampão de ruptura. Para realizar a eletroforese em condições nativas, preparou-se um eletrólito com 1% de SDS. Além disso, as amostras, foram adicionadas 0,02% (v/v) de Triton X-100 e não foram submetidas à fervura.

Após a corrida no equipamento de eletroforese o gel foi lavado 3 vezes com água destilada e equilibrado reativando em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 com 2,5% (v/v) de Triton X-100 por 30 min em temperatura ambiente.

O outro gel formado foi feito através da seguinte composição: o substrato cromogênico foi preparado dissolvendo 2% do substrato lipídico (tributirina) em água destilada, contendo ágar (2%, m/v), *phenol red* (0,01% m/v), e uma solução de CaCl₂ 10 mM. O pH da mistura foi aferido para 7,3-7,4 com uma solução de NaOH ou HCl. A solução foi homogeneizada no equipamento Turrax por um min, no ultrassom por mais 2 min, colocada em uma placa de Petri e levada a 100 °C. Em seguida, foi colocada na geladeira para que o gel fosse resfriado e solidificado. A placa de ágar contendo o gel formado foi sobreposto com o gel nativo e, em seguida, incubado a 40 °C na estufa bacteriológica por 20 horas. A presença de lipase foi evidenciada pela formação de um traço amarelo no meio rosa, devido a mudança de pH proveniente do ácido graxo liberado (SINGH *et al.*, 2006) na hidrólise da tributirina. A determinação da atividade na amostra retida no gel ocorre pela presença de uma coloração diferenciada na parte do gel onde se encontra a enzima em contato com o substrato, no caso, a tributirina.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Ensaio preliminares

5.1.1 Avaliação do tempo necessário para o rompimento celular e liberação da enzima

A Tabela 7 mostra a atividade do extrato contendo a enzima intracelular, após ruptura. O tempo de 2 min foi suficiente para a ruptura da célula, visto que quando submetido a um período maior (4 min) a atividade no extrato diminuiu. A concentração de células utilizada de 0,1 mg por mL de tampão, foi favorável ao rompimento, pois um volume pequeno facilitou a homogeneidade de sonicação, no entanto um maior tempo de exposição ao calor pode ter ocasionado algum tipo de desnaturação da lipase no extrato.

Tabela 7 – Atividade do extrato enzimático de *C. rugosa*, lipase intracelular, obtido em diferentes tempos (2 e 4 min) de rompimento celular utilizando ultrassom de ponteira

Tempo de sonicação (min)	Atividade enzimática (U/L)
2	448 ± 11
4	218 ± 10

A ruptura de células através do ultrassom é muito utilizada devido sua eficiência (KAPTUROWSKA *et al.*, 2012; KNORR *et al.*, 2004) que permite romper a parede celular através da cavitação. E também, para biocatálise esse método de rompimento da parede celular é importante por se tratar de uma via verde (KONWARH *et al.*, 2012; OYANE *et al.*, 2009; VILKHU *et al.*, 2008). Em Ciafardini *et al.* (2006) foi utilizado uso do ultrassom para o rompimento celular de leveduras isoladas do azeite de oliva. O tempo foi de 10 min, a uma potência de 70 W, para a extração da lipase intracelular produzida pela levedura *Williopsis californica* 1639. Ertugul *et al.* (2007) trabalharam com bactéria *Bacillus sp.*, também utilizaram a sonicação, durante 5 min a 60 W, para a obtenção da lipase intracelular. Desta forma, esse método foi utilizado no presente estudo para o rompimento celular das leveduras *C. rugosa*. Para ensaios com *C. tropicalis* e *M. caribbica* também foi utilizado o mesmo tipo de rompimento uma vez que os resultados também foram adequados.

5.1.2 Testes de metodologia de determinação da atividade enzimática

Esse teste foi feito para verificar qual substrato tinha maior afinidade pela lipase produzida a partir da levedura isolada por *C. tropicalis*. Esse processo é importante, uma vez que verifica quais substratos a enzima apresenta maior atividade e não há dados ainda na literatura sobre o micro-organismo estudado. As lipases de *C. rugosa* já são bem mais exploradas (SHARMA *et al.*, 2013; KANNAPPAN; SANTHI, 2013; ZHAO *et al.*, 2008; VAKHLU AND KOUR, 2006).

Tabela 8 – Teste de hidrólise por ésteres sintéticos da lipase produzida por *C. tropicalis*

Substratos	Atividade (U/L)
pNFB	0
pNFL	328,8 ± 70
pNFP	65,1 ± 10

A enzima lipase produzida por *C. tropicalis* não apresentou atividade frente ao substrato de cadeia curta (p-nitrofenil butirato - pNFB), como mostrado na Tabela 8. Para os substratos de cadeia intermediária (p-nitrofenil laurato - pNFL) e para ésteres de cadeia mais longa (p-nitrofenil palmitato - pNFP), a lipase apresentou atividade, sendo a atividade frente a p-nitrofenil palmitato menor quando comparada ao p-nitrofenil laurato. O substrato pNFL foi utilizado em ensaios posteriores de atividade enzimática.

Esses resultados mostram que a lipase produzida pela *C. tropicalis* tem mais afinidade com os ésteres de cadeias maiores (C12 - C16). A afinidade de uma lipase a um dado substrato é referente, de modo direto, à interação deste com os resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico. Esta afinidade também está relacionada com a quantidade de lipase presente no meio (mais de uma isoforma) (BRÍGIDA, 2010). Outros estudos mostram lipases produzidas por leveduras com afinidade a substratos de cadeia intermediária, em Liu *et al.* (2008), a produção de lipases a partir de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 foi aplicada na hidrólise de óleos comestíveis. Em Kumar *et al.* (2005) a lipase produzida por *Bacillus coagulans* BTS-3 também teve maior afinidade para hidrólise de ésteres de cadeia média e longa, do que para ésteres de menor cadeia e foi indicada para síntese de alguns ésteres de interesse industrial.

5.1.3 Meio sintético inicial com adição de vitaminas

5.1.3.2 *C. tropicalis*, *M. caribbica* e *C. rugosa*

As leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica* foram testadas inicialmente em um meio de cultivo com vitaminas. Neste experimento, a produção de lipase extracelular foi maior que a intracelular. Esse resultado foi muito bom inicialmente, porque um outro meio sintético inicial testado (metodologia de Benjamin e Pandey, 1995) sem a presença de vitaminas apresentou resultado inferior (somente atividade intracelular 60 U/L para *C. tropicalis* e 25 U/L para *M. caribbica*) (Pantoja *et al.*, 2014), uma vez que as atividades lipolíticas determinadas foram quantidades menores comparado ao meio quando se utilizou vitaminas.

Como o objetivo do trabalho é produzir a lipase em meios alternativos para minimizar custos, partiu-se para esse propósito, o qual foram testados outros meios sintéticos sem a presença de vitaminas e por fim, resíduos agroindustriais de forma a atingir o objetivo.

Nesses resultados preliminares, a otimização do meio de cultura e a de rompimento ainda não estavam ajustadas, por isso a informação importante que se deve retirar desses experimentos é determinar se a levedura produz ou não a enzima. Vale frisar que esses ensaios são úteis e podem ser melhorados, a fim de reduzir a quantidade de vitaminas utilizadas nesses meios de cultura. No entanto, o objetivo do trabalho é utilizar meios alternativos que possam ter boas quantidades de nutrientes.

A Tabela 9 mostra resultados de biomassa e produção de lipase em meio sintético com a adição de vitaminas para as três leveduras testadas. Observa-se que esse meio favoreceu o crescimento da biomassa e também a produção da lipase.

Esse experimento foi importante, porque foi uma forma de comparar a produção da lipase da levedura *C. rugosa* com as leveduras não convencionais. Pôde ser observada que a lipase produzida pela *C. rugosa* foi totalmente extracelular, o que facilita a aplicação em larga escala para processos industriais. (SILVEIRA *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2002).

Tabela 9 – Lipase produzida por *C. tropicalis*, *M. caribbica* e *C. rugosa* em meio de cultura sintético com adição de vitaminas a 30 °C e pH inicial 6,0

Levedura	Biomassa (g/L)	Atividade Intracelular (U/L)	Atividade Extracelular (U/L)
<i>C. tropicalis</i>	3.08 ± 0.1	37.75 ± 1.1	70.14 ± 4.6
<i>M. caribbica</i>	2.45 ± 0.1	42.01 ± 0.6	68.90 ± 2.9
<i>C. rugosa</i>	1.60 ± 0.0	-	175.8 ± 6.5

Pela Tabela 9, foi observado também que a levedura *M. caribbica* apresentou bons resultados frente a *C. tropicalis*, o que mostra que essa levedura produz lipase em meio de cultivo com vitaminas.

5.2 Avaliação de meio de cultura sintético para a produção de lipases

5.2.1 *C. tropicalis*

O mesmo meio de cultura sintético sem nenhum tipo de vitaminas que foi testado para *C. rugosa* também foi utilizado para a produção de lipase pela *C. tropicalis* (Tabela 10). Ensaio preliminares, inicialmente com Tween 80, mostraram que essa cepa também é produtora da enzima referida (SÁ *et al.*, 2013; PLOU *et al.*, 1998). Portanto, esta levedura foi avaliada e os resultados de produção de lipases estão na Tabela 10. Vê-se que a levedura *C. tropicalis* foi capaz de produzir a lipase no meio sintético C, mas em quantidades menores do que a *C. rugosa* (atividade extracelular 172 U/L e atividade intracelular 282 U/L em 48 h).

Tabela 10 – Atividade da lipase produzida por *C. tropicalis* em 24 h, 48 h e 72 h de cultivo em meio sintético C utilizando pNFL como substrato

Tempo (h)	Atividade extracelular (U/L)	Atividade intracelular (U/L)
24	73.55 ± 5,0	171.09 ± 3,2
48	63.64 ± 6,8	136.56 ± 13,1
72	69.08 ± 4,5	191.56 ± 12,2

5.2.2 *M. caribbica*

A levedura *M. caribbica*, quando cultivada em meio sintético, não produziu lipases. As formas de assimilação dos substratos pelos micro-organismos são diferentes, por isso mesmo assim, a levedura foi ainda testada em cultivo submerso utilizando meio com resíduos agroindustriais. Em Kumar *et al.* (2005) na produção de lipase a partir de *Bacillus coagulans* BST-3 foi melhor em óleo de mostarda, após o estudo de várias fontes de carbono.

5.2.3 *C. rugosa*

Verificou-se que os três meios de cultura sintéticos estudados (Tabela 4) foram satisfatórios para a produção de lipase (Tabela 11). Todos estes meios continham glicose (fonte de carbono), extrato de levedura e peptona (fonte de nitrogênio), além do ácido oleico como indutor. A lipase intracelular foi produzida em quantidades semelhantes em todos os meios de cultura (A, B e C). A lipase extracelular foi encontrada apenas nos meios de cultura C ($143,0 \pm 18^a$ U/L) e B ($154,7 \pm 10^a$ U/L). Porém a quantidade de extrato de levedura no meio C foi bem menor (4 g/L), então esse meio foi escolhido por ser 70% menos dispendioso.

Não foi detectada atividade de lipase extracelular quando se utilizou meio A. Esse meio inicialmente havia apenas 1 g/L de glicose, mas havia uma quantidade muito grande de extrato de levedura, que em algumas ocasiões pode ser usada pela levedura como também fonte de carbono, isso deve ter ocorrido, por que esse meio propiciou a produção da lipase intracelular (60 U/L).

Pôde ser observado também que a glicose não foi totalmente consumida nos meios B e C. O meio B possui inicialmente a metade da quantidade de açúcar do meio C. Por esse motivo, a quantidade de glicose foi reduzida pela metade no meio sintético C, para os estudos seguintes.

No meio de cultura C, foi utilizada glicose como fonte de carbono, além de extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio. Outros autores também avaliaram o efeito da fonte de carbono para produção da lipase. Lin et al. (2006) estudaram a produção lipases por *Antrodia cinnamomea*. Após ser testados várias fontes de carbono a maior atividade lipolítica foi encontrada utilizando o glicerol com 26,69 U/L. O trabalho dele apresentou quantidades menores de lipase produzida em relação a este trabalho que utilizou glicose como fonte de carbono.

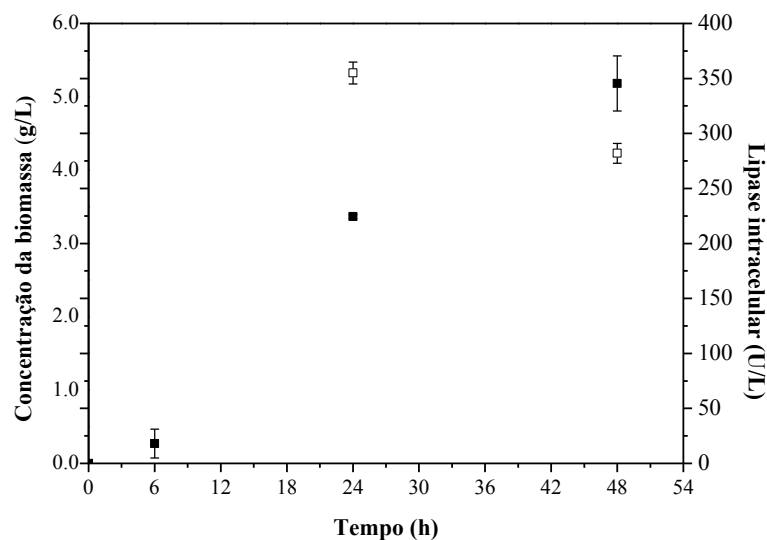
Tabela 11 – Produção de lipase por *C. rugosa* nos meios de culturas A, B e C em 72 h de cultivo

Meios	Atividade extracelular (U/L)	Atividade intracelular (U/L)	Açúcar residual (g/L)	Proteína (g/L)
A	-	60.0 ± 0^a	-	0.15 ± 0.0
B	154.7 ± 10^a	82.5 ± 8^b	2.34 ± 0.1^a	0.85 ± 0.3
C	143.0 ± 18^a	59.7 ± 10^a	5.10 ± 0.3^b	1.12 ± 0.0

A fonte de carbono é um fator importante na produção de lipases (GUPTA *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2001), porque é o principal componente da célula e fornece energia para seu crescimento (GONÇALVES *et al.*, 2007). Em De Almeida *et al.* (2013), foram testadas várias fontes de carbono para produção de lipase por *Candida viswanathii*: glicose, galactose, lactose, manitol, sorbitol, glicerol, ácido cítrico e ácido láctico. Esses carboidratos possibilitaram o crescimento da levedura, mas não a produção da enzima. A enzima só foi produzida na presença de ácido oleico no meio de cultura.

A Figura 4 ilustra o crescimento celular da *C. rugosa* em meio sintético C, contendo glicose, extrato de levedura, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, peptona e ácido oleico em tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, bem como produção da lipase intracelular. As atividades intracelulares foram 355 ± 13 U/L e 282 ± 14 U/L, em 24 e 48 h de cultivo, respectivamente. Esse meio de cultura sintético tamponado proporcionou uma produção de lipase intracelular bem maior do que o meio C, sem tampão fosfato. Isso ocorreu porque o pH ótimo da enzima lipase é em torno de 7,0 (DE MORAIS *et al.*, 2016; KUMARI e GUPTA, 2012; BUSSAMARA *et al.*, 2010). Quando o meio de cultivo não era tamponado, ocorria a produção da enzima, mas o crescimento da levedura reduzia bastante o pH, chegando a 4,5, fazendo com que a lipase sofresse desnaturação e fosse observado o decaimento de sua atividade.

Figura 4 – Lipase produzida por *C. rugosa* em meio de cultura sintético a 30 °C e pH 6,5. Crescimento celular (■) e atividade intracelular (□).



Wei et al. (2004) utilizaram um meio de composição semelhante (contendo ácido oleico, sais e vitaminas) e pH 6,3, a 30°C, como condições de cultivo, para produzir lipase de *C. rugosa*, sendo a atividade da lipase intracelular de 116,91 U/L. O resultado deste trabalho foi superior (355 ± 13 U/L) e teve um custo menor devido a não utilização de vitaminas.

A composição do meio sintético para produção da lipase neste ponto ficou definida, com glicose (10 g/L), extrato de levedura (4 g/L) e ácido oleico (1% v/v), além de sulfato de amônio (0,5 g /L) e peptona (3 g /L) em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0.

5.3 Avaliação de meios de cultura contendo resíduos alternativos para a produção de lipases

5.3.1 *M. caribbica* e *C. tropicalis*

Após testada a produção de lipases a partir das leveduras não convencionais em meio sintético, seguiu-se para produção da enzima utilizando 4 meios alternativos como meio de cultura. Nas Figuras 5 e 6 apresentam resultados de cultivo utilizando 4 meios alternativos para a levedura *M. caribbica* e para a *C. tropicalis*, respectivamente.

Na Figura 5, observam-se os resultados para a *C. tropicalis*. O único meio que permitiu a produção de lipase intracelular por *C. tropicalis* foi o meio 4. Esta levedura produziu lipase com atividade intracelular de 110 ± 10 U/L em 24 horas de cultivo, e de $140 \pm 0,0$ U/L em 48 horas. Foi observado que, nesse meio, a quantidade de proteína intracelular produzida pela *C. tropicalis* foi maior do que nos outros meios. No meio 2, a levedura *C. tropicalis* também produziu uma quantidade de proteína próxima à do meio 4 (APÊNDICE 2), mas não se obteve produção de lipase.

Para *Meyerozyma caribbica*, os meios 2 e 4 propiciaram a produção de lipase (FIGURA 6), no entanto, no meio 4 a produtividade foi maior (6,41 U/L.h), quando comparada à produtividade no meio 2 (3,43 U/L.h). O meio 2 também possui em sua composição milhocina. A presença da milhocina tornou o meio 2 rico em nutrientes, o que pode ter favorecido a produção de lipase pela levedura *M. caribbica*, não tendo isso ocorrido para a *C. tropicalis*. A *M. caribbica* utilizou a milhocina do meio 2 como fonte de nitrogênio para produção da enzima, isso estar relacionado a via metabólica utilizada por esse micro-organismo. Observou-se também que a *C. tropicalis* produziu menos proteína intracelular do que a outra levedura, em 24 horas de cultivo (APÊNDICE 2), no entanto, a atividade extracelular a lipase produzida foi maior, como mostrado na Tabela 12.

Figura 5 – Atividade extracelular e intracelular da lipase produzida pela *C. tropicalis* nos 4 meios alternativos. Lipase extracelular 24 h (■), lipase intracelular 24 h (■), lipase extracelular 48 h (■), lipase intracelular 48 h (■).

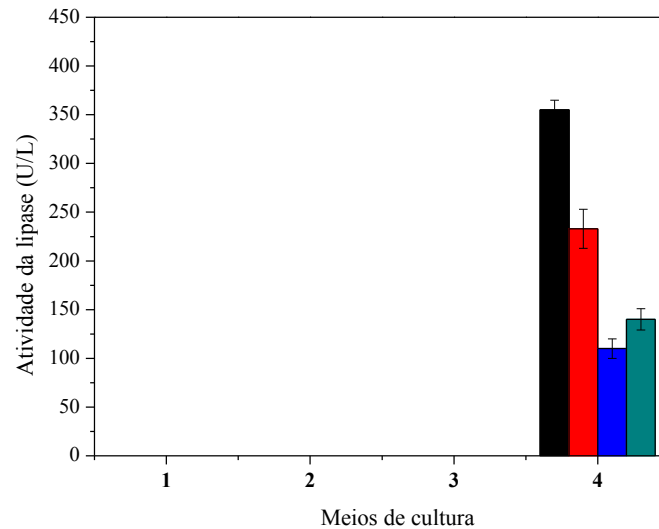
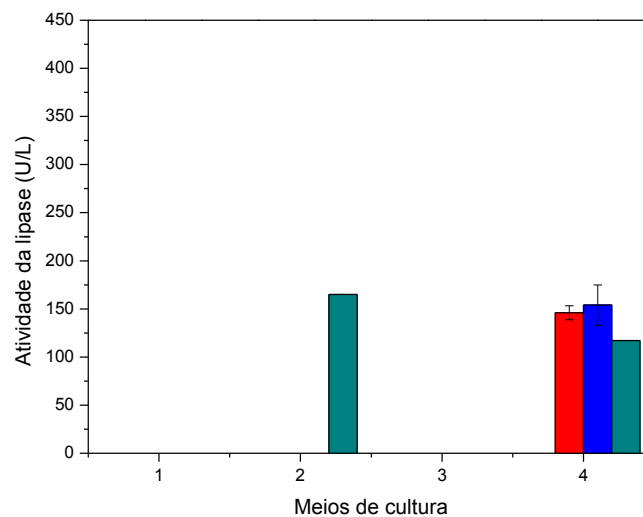


Figura 6 – Atividade extracelular e intracelular da lipase produzida pela *M. caribbica* nos 4 meios alternativos. Lipase extracelular 24 h (■), lipase intracelular 24 h (■), lipase extracelular 48 h (■), lipase intracelular 48 h (■).



Fazendo um comparativo entre as atividades extracelulares das duas leveduras (Tabela 12), observa-se que para a *C. tropicalis*, em 24 horas, a atividade da lipase

extracelular foi 233 ± 10 U/L, e para a *M. caribbica* foi $146 \pm 7,30$ U/L. Isto mostra que a *C. tropicalis* produziu mais lipase extracelular do que a *M. caribbica*, em 24 horas de cultivo. Para a *C. tropicalis*, o resultado foi ainda melhor em 48 horas, período no qual a *M. caribbica* não produziu lipase extracelular. Pode-se perceber que ocorreu alguma desnaturação da enzima nas últimas 24 horas. A falta de algum nutriente pode ocasionar também mudança no perfil metabólico celular, retirando o desvio na produção da enzima lipolítica.

Tabela 12 – Atividade enzimática extracelular para as leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica* no meio 4

Tempo (h)	<i>C. tropicalis</i>	<i>M. caribbica</i>
	Meio 4 (U/L)	Meio 4 (U/L)
24	233 ± 10	$146 \pm 7,30$
48	355 ± 20	-

A literatura relata que outros meios de cultura são testados na produção de lipase. No trabalho de Bussamara et al. (2010), foi utilizado um meio com glicose (2,0 g/L), peptona (5,0 g/L), $MgSO_4$ (0,1 g/L) e K_2HPO_4 (1,0 g/L) suplementado com óleo de soja (20,0 g/L) ou de gordura de bovina (20,0 g/L), para produção de lipase a partir da cepa *P. hubeiensis* HB85. Os resultados de atividade foram 610 U/L em gordura bovina e 386 U/L em óleo de soja. Essas atividades foram maiores do que a deste trabalho, porém esse meio utilizado por eles foi mais dispendioso, uma vez que utilizaram componentes sintéticos e uma fonte indutora provinda de alimentos.

5.3.2 *C. rugosa*

Foi utilizado o mesmo protocolo das leveduras não convencionais para a levedura *C. rugosa*. Os resultados foram apresentados na Tabela 13, observa-se que o meio de cultivo número 4 (melaço, milhocina, OMW, sulfato de amônio e peptona, Tabela 5) foi o que proporcionou a maior produção de lipase pela *C. rugosa*, em 24 h de cultivo, com uma atividade da lipase extracelular de 561 ± 30 U/L e de 269 ± 5 U/L para a atividade intracelular.

O meio de cultura 4, contendo melaço, cerca de 50% de carboidratos, (GUDIÑA et al., 2015), 5 g/L de proteína na milhocina e 78,5% de ácido oleico dentre os óleos presentes nas águas residuais da produção de azeite (MENESES et al., 2017), favoreceu a produção de lipase. Outros meios de cultura também foram satisfatórios para a produção de lipase e o meio

de cultura 2 apresentou o segundo melhor resultado para a atividade da lipase extracelular (424 ± 20 U/L).

Tabela 13 – Atividade enzimática da lipase produzida por *C. rugosa*, depois de 24 h de cultivo, usando diferentes meios de cultura (reportado no item 4.1.3)

Meio	Biomassa (g/L)	Atividade enzimática (U/L)		Atividade específica intracelular (U/mg)
		Extracelular	Intracelular	
1	3.63 ± 0.05	143 ± 20	214 ± 10	0.164 ± 0.03
2	4.88 ± 0.03	424 ± 20	95 ± 30	0.079 ± 0.01
3	4.83 ± 0.39	213 ± 10	165 ± 20	0.287 ± 0.04
4	4.39 ± 0.04	561 ± 30	269 ± 5	0.331 ± 0.00

Outras pesquisas relatam a potencial utilização de resíduos alternativos agroindustriais para a produção de lipases. Por exemplo, Salihu et al. (2011) produziram lipase ($20,26$ U/mL) por *Candida cylindracea*, usando um meio contendo óleo de palma (retirado a partir de efluentes gerados em uma fábrica de extração desse óleo), além de peptona e Tween 80. Tommaso et al. (2010) utilizaram um meio de cultura contendo soro de queijo, extrato de malte, extrato de levedura, Tween 80 e azeite, e obtiveram, após 120 h de cultivo, uma atividade lipásica de $5,18$ U/mL. Maldonado et al. (2012) utilizaram óleo de canola, girassol, milho, soja e azeite como indutores de produção de lipases. As condições ótimas foram de $3,0\%$ (w/v) de peptona e $0,5\%$ (w/v) de óleo de soja. Os resíduos agroindustriais e subprodutos são cada vez mais utilizados como fontes de carbono e nitrogênio. Estes meios de cultura tornam possível a redução de custos e geram cadeias produtivas para esses meios alternativos.

5.4 Análise da produção de proteases

5.4.1 *C. tropicalis* e *M. caribbica*

A Tabela 14 mostra as atividades hidrolíticas de proteases presentes nos extratos brutos obtidos, com ou sem a presença de PMSF. Observou-se que o extrato extracelular da *M. caribbica* apresentou elevados níveis de protease, enquanto o extrato extracelular da *C. tropicalis* apresentou um coeficiente baixo, isso pode explicar a maior performance da atividade lipásica para *C. tropicalis* que na *M. caribbica*.

Por causa destes resultados, foi acrescentado nos extratos o fluoreto de

fenilmetilsulfonilo (PMSF), um inibidor de serina-proteases (BOSE *et al.*, 2013; KUMARI e GUPTA 2012), mas pode ser observado ainda na Tabela 14 que não diminuiu totalmente a protease presente nos meios, possivelmente esse inibidor não foi capaz da inibição proteolítica destas enzimas. Experimentos mais abrangentes permitem definir qual o melhor método de inibição de outras proteases existentes no extrato.

Tabela 14 – Atividade proteolítica das leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica*. Amostras produzidas através de cultivo em frascos utilizando meio com resíduos por 48 h de cultivo

Tipo de lipase	Antes PMSF	Depois PMSF
<i>C. trop</i> extra (U/L)	50	8,3
<i>M. carib</i> extra (U/L)	1150	1000

5.4.2 *C. rugosa*

Em meios de cultivo com resíduos, as proteases foram também produzidas pela *C. rugosa*. Em 24 horas de cultivo, o extrato de *C. rugosa* apresentou protease intracelular, com atividade de 233 U/L e extracelular 250 U/L (Tabela 15). Em 48 horas, apresentou protease extracelular (413 U/L) e intracelular (313 U/L). Esses resultados foram medidos após cultivo. Este resultado pode explicar a redução da produção de lipase em 48 horas para essa levedura.

Tabela 15 – Atividade proteolítica de *C. rugosa*. Amostras produzidas em cultivo submerso em reator em meio com resíduos

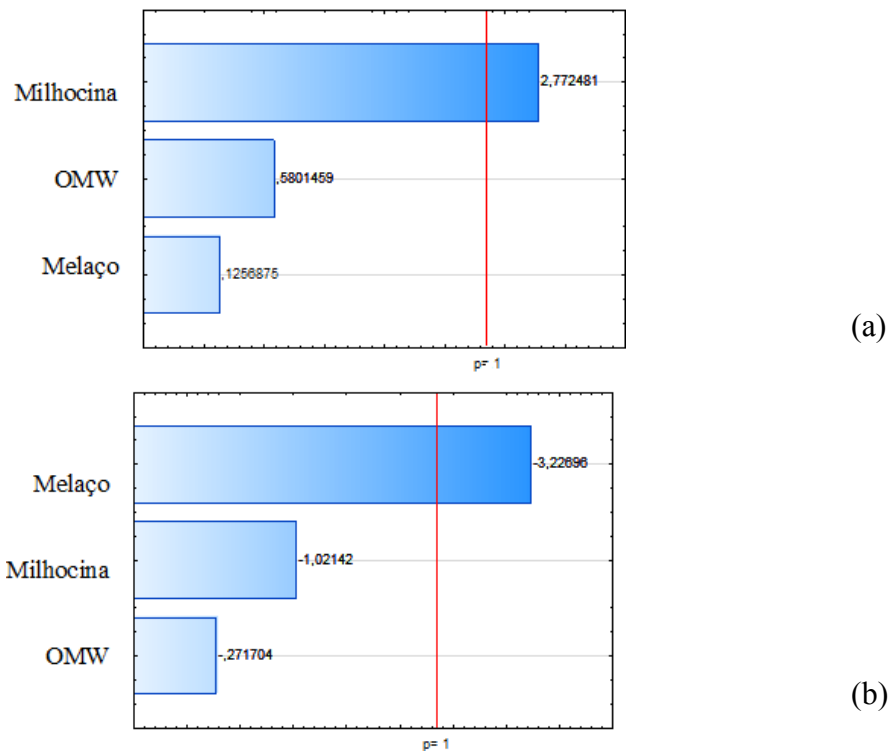
Tipo de lipase	Proteases	
	24 h	48 h
<i>C. rugosa</i> extra (U/L)	250	413
<i>C. rugosa</i> intra (U/L)	233	313

5.5 Influência da concentração de substratos na produção de lipases

Um planejamento fatorial fracionado foi realizado para se verificar o efeito das diferentes concentrações dos substratos presentes no meio 4 na lipase produzida por *C. rugosa*. A Figura 7-a ilustra o impacto do melão, da milhocina e do OMW na atividade extracelular da lipase. Todos os componentes apresentaram um efeito positivo sobre a produção de lipase extracelular. No entanto, apenas no caso de milhocina, este efeito foi estatisticamente significativo. Por outro lado, todos os componentes avaliados exibiram um

efeito negativo na produção da lipase intracelular (Figura 7-b), embora, neste caso, o efeito tenha sido estatisticamente significativo apenas para o melãoço.

Figura 7 – Efeito dos três substratos, milhocina, OMW (olive mill wastewater) e melãoço na atividade extracelular (a) e intracelular (b) da lipase. 2^{3-1} modelo experimental fracionado, MS residual: 0.0059499



A milhocina teve um efeito positivo sobre a atividade da lipase extracelular, isso talvez porque esse componente é um subproduto que, além de ter carboidratos e proteínas, tem também substâncias com características similares as de tensoativos (VECINO *et al.*, 2014). Portanto, a milhocina pode ter o mesmo efeito como Tween 80, que é usado nos meios de cultura para a produção de lipase. O Tween 80 estimula a produção de lipase e libera, para fora da célula, a enzima produzida, o que resulta num aumento da atividade da lipase extracelular (KIM *et al.*, 2010; DALMAU *et al.*, 2000).

O melãoço teve um efeito negativo na produção da lipase intracelular (Figura 7-b). Isso aconteceu, talvez, devido à presença de glicose na milhocina, resultando numa quantidade de glicose maior do que a necessária para a célula. Alguns trabalhos anteriores mostraram que a glicose reprime a produção de lipase. Em seu trabalho, Dalmau *et al.* (2000) relataram que a elevada quantidade de glicose no meio de cultura leva à baixa produção de lipase. Fickers *et al.* (2003) relataram que a produção da lipase extracelular de *Yarrowia*

lipolytica, por CBS6303, foi reprimida por glicose e glicerol, mas aumentou na presença de ácido oleico. Kumar et al. (2011), usando um modelo estatístico, descobriram que a glicose não foi uma variável importante na produção de lipase por *Bacillus pumilus RK31*. A glicose é muito importante para o crescimento da levedura, mas em quantidade demasiada pode atrapalhar, isso porque a levedura precisa consumir também a fonte indutora para a produção da lipase, o que não ocorre quando a glicose está em excesso no meio.

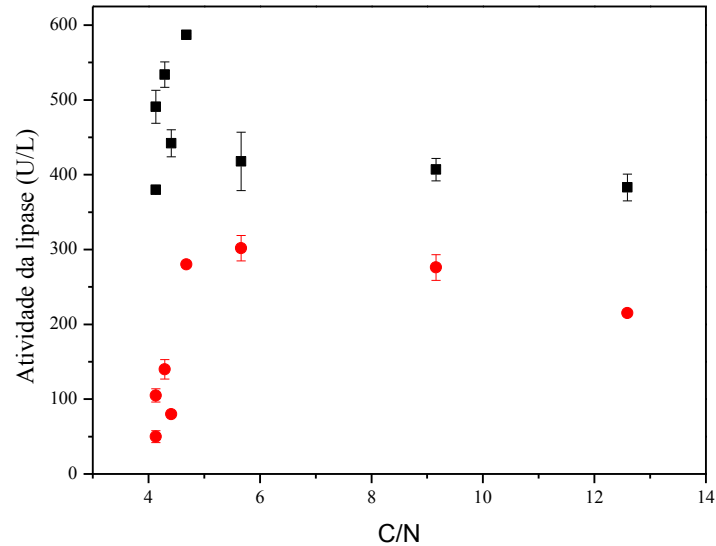
Em resumo, a partir do planejamento fatorial fracionado, o meio 4 foi modificado, ficando com a seguinte composição: melaço (5 g/L de açúcar redutor) g e milhocina (6 g/L de nitrogênio) e OMW (0,5 % v/v), 0,5 g/L de sulfato de amônio e 3 g/L de peptona. Depois de se ajustar o meio de cultura, a atividade da lipase extracelular obtida foi de 587 ± 12 U/L, e a atividade da lipase intracelular de 262 ± 7 U/L, em 24 h de cultivo.

5.6 Avaliação da influência da razão C/N na produção de lipase por *C. rugosa*

Com base nos resultados anteriores, o impacto da concentração da milhocina na produção da lipase foi ainda avaliado. Estes resultados estão reunidos na Figura 8, na qual se pode verificar que um aumento na razão carbono/nitrogênio, acima de 4,68 não promoveu uma produção maior de lipase extracelular, isso se deve talvez ao fato de que a razão necessária para a produção da lipase foi alcançada. Essa razão de 4,68 é próxima a quantidade necessária para a produção de biomassa (razão C/N 4,51), ou seja, nessa faixa existe competição entre a produção da enzima e o crescimento celular. Em concentrações maiores que essa razão (4.51) a via metabólica da levedura não consegue direcionar-se para produzir mais quantidade de enzima, isso acontece porque uma maior quantidade de substrato no meio faz com que a célula diminua seu metabolismo (região de não competição). Segundo Hiol et al. (1999), a relação carbono-nitrogênio de 10:1 garante um alto conteúdo protéico. O nível de produção de enzimas diminuiu lentamente em altas razões C:N (CAPUTO, 2012). Em Rigo (2009) para produção de lipases a partir do fungo *Penicillium 58F* a razão carbono-nitrogênio de 6,11 foi a que resultou em melhores resultados de produtividade.

Outro elemento muito importante na produção da lipase é o oxigênio (TAKAÇ et al., 2010, DE MARIA et al., 2006, ALONSO et al., 2005). Uma menor quantidade de oxigênio no meio pode também influenciar negativamente a produção da enzima.

Figura 8 – Efeito da razão carbono e nitrogênio na atividade extracelular (■) e intracelular da lipase produzida (●) por *C. rugosa*.



5.7 Comparativo entre as leveduras avaliadas

Todos os resultados de comparação das três leveduras obtidas para produção de lipase utilizando o meio alternativo número 4 estão apresentados na Tabela 16. Observa-se que as atividades extracelulares e intracelulares foram maiores para *C. rugosa*. Isso resultou em parâmetros melhores de atividade intracelular específica e atividade extracelular por unidades de células também maiores para essa levedura.

Pode ser visto, também que, as atividades extracelulares das leveduras *C. rugosa*, *C. tropicalis* e *M. caribbica* são maiores que as atividades intracelulares, o que mostra que esse meio de cultura 4 evidenciou a produção da lipase extracelular, que é muito importante porque reduz gastos de purificação dessa enzima. Para a indústria, as enzimas intracelulares não são atrativas, elas somente são utilizadas quando o micro-organismo não excreta de forma nenhuma a enzima, uma vez que a etapa de purificação aumenta muito custos de produção.

Tabela 16 – Resultados do cultivo em frascos pelas leveduras *C. tropicalis*, *M. caribbica* e *C. rugosa* em meio 4 modificado

Parâmetros	<i>C. tropicalis</i>		<i>M. caribbica</i>		<i>C. rugosa</i>	
	24 h	48 h	24 h	48h	24 h	48 h
Biomassa (g/L)	3,34	7,00	6,30	6,92	3,51	3,29
Ativ. extra (U/L)	350	396	268	227	561	399
Proteína (mg/mL)	1,77	2,83	0,86	0,929	0,889	1,001
Ativ. intra (U/L)	193	245	208	96	269	262
Ativ. específica intra (U/mg)	0,109	0,087	0,242	0,103	0,313	0,264
Ativ. específica extra (U/cel)	0,105	0,057	0,043	0,033	0,159	0,121

Confrontando ainda as duas leveduras isoladas do bagaço de caju, verifica-se que suas atividades específicas foram próximas, exceto para a produção da *M. caribbica* em 24 horas, que foi o dobro (0,242 U/mg) em relação à da *C. tropicalis* (0,109 U/mg). As produções de biomassa foram bem parecidas, mas a atividade específica extracelular por unidades de células (última linha da Tabela) foi maior para a *C. tropicalis* (0,105 e 0,057 contra 0,043 e 0,033). Essa levedura foi, então, a escolhida para testes em biorreator.

5.8 Produção de lipase em biorreator

5.8.1 *C. rugosa*

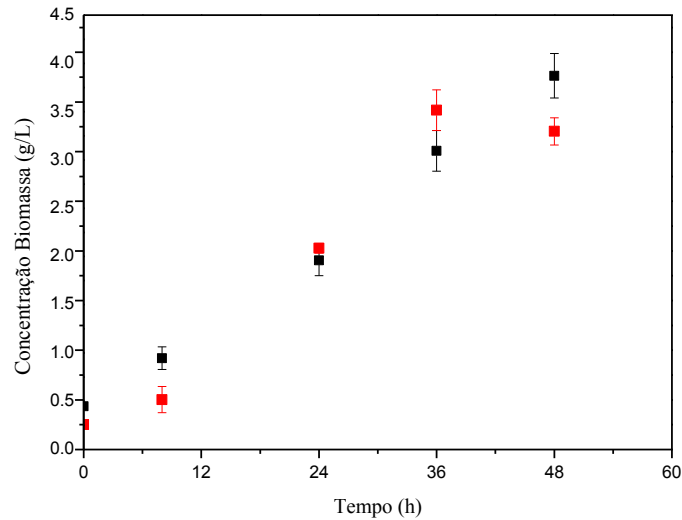
O meio alternativo 4 após modificado (resultado do planejamento fatorial) foi utilizado para o cultivo da *C. rugosa* em biorreator. A Figura 9 mostra os resultados da biomassa comparando os dados obtidos em frascos com os dados alcançados no biorreator. Os resultados mostram que as atividades do cultivo realizadas em frascos foram menores (Figura 10 e Figura 11), exceto para a atividade intracelular em 48 h de cultivo (margem de erro grande para atividade produzida em biorreator).

Em relação à influência do tempo de cultivo, de 24 ou 48 horas, a tendência foi a mesma, sendo a produção da lipase maior nas primeiras 24 h. Isso acontece, talvez, porque nas 48 h de cultivo haja falta de algum nutriente para as leveduras continuarem a produzir a enzima.

O crescimento da biomassa foi similar para os dois tipos de processo, mas em 36 horas no cultivo em frascos se manteve praticamente constante (leve declive) isso mostra que o estado estacionário foi atingido. No cultivo em biorreator, a biomassa continuou aumentando até as 48 horas, não chegando a atingir o estado estacionário, mas a produção de

lipase começou a decair, devido possivelmente a falta de algum nutriente para o micro-organismo ou devido a produção de protease, por isso o processo foi interrompido.

Figura 9 – Produção de lipase por *C. rugosa* usando meio com resíduos: biomassa, frascos (■), biorreator (■).



Esta diferença observada entre frascos e biorreator está de acordo com outros estudos relatados na literatura. Bussamara et al. (2010) relataram uma atividade de lipase de 386 U/L em frascos e de 1.232 U/L no biorreator. Kastranov et al. (2008) alcançaram atividades de lipase em frascos de 1.1050 U/L e no biorreator de 14.530 U/L, a em cultivo usando *Candida cylindracea* NRRL Y-17506. Os valores deste trabalho foram inferiores aos dos autores citados, talvez porque não houve fornecimento de oxigênio para o biorreator.

Figura 10 – Produção de lipase por *C. rugosa* usando meio com resíduos: atividade extracelular, frascos (■), biorreator (■).

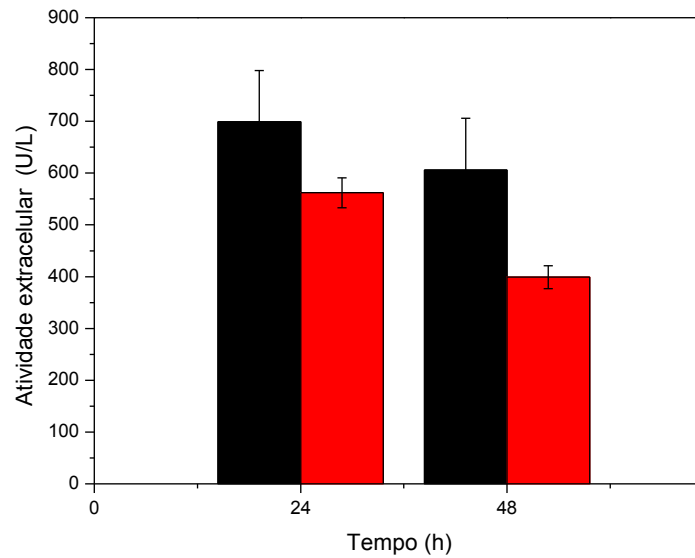
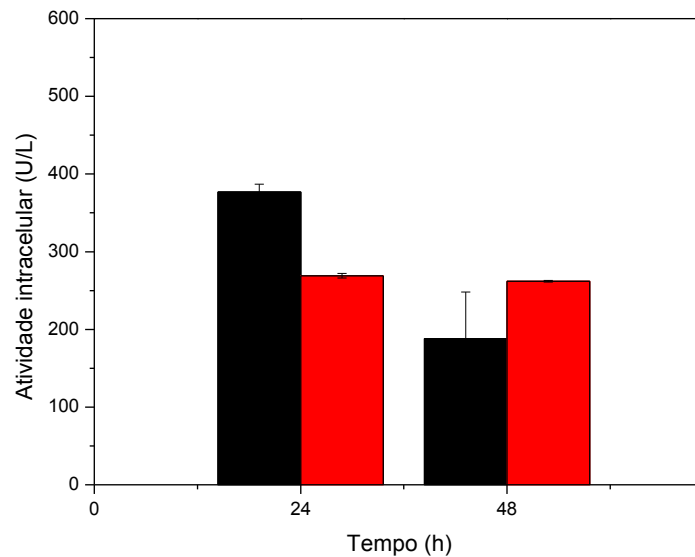


Figura 11 – Produção de lipase por *C. rugosa* usando meio com resíduos: atividade intracelular, frascos (■), biorreator (■).



5.8.2 *C. tropicalis*

A produção de lipase por *C. tropicalis* em biorreator foi feita de duas formas: em meio sintético (Figura 12) e em meio contendo resíduos (Figuras 13, 14 e 15) a título de

comparação da produção da enzima e melhor condução do crescimento celular entre os dois cultivos. A Figura 12 mostra, em resumo, os resultados da produção da *C. tropicalis* em biorreator, meio sintético.

Figura 12 – Produção de lipase por *C. tropicalis* em biorreator usando meio sintético: biomassa (■), açúcar (■), atividade extracelular (◆) e intracelular (▶).

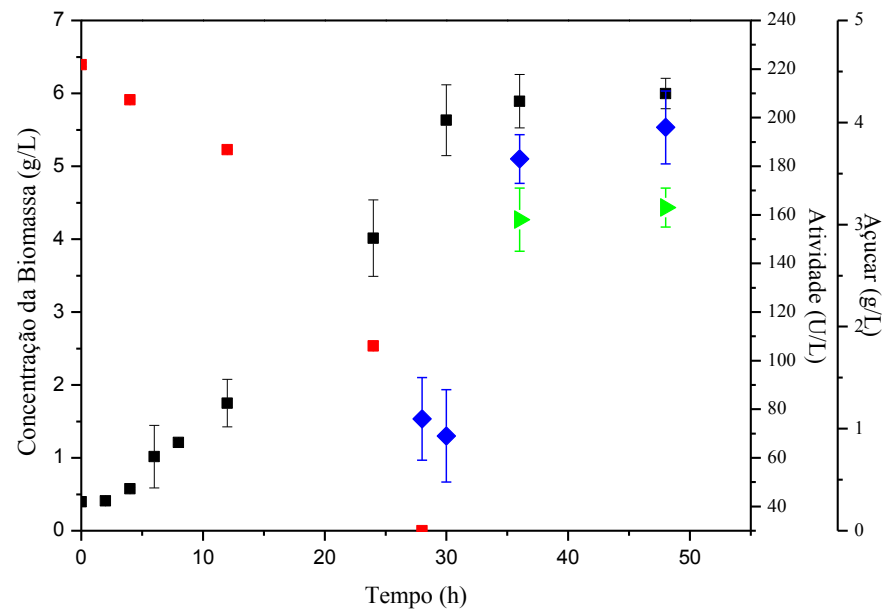


Figura 13 – Produção de lipase por *C. tropicalis* usando meio com resíduos biomassa, frascos (■), biorreator (■).

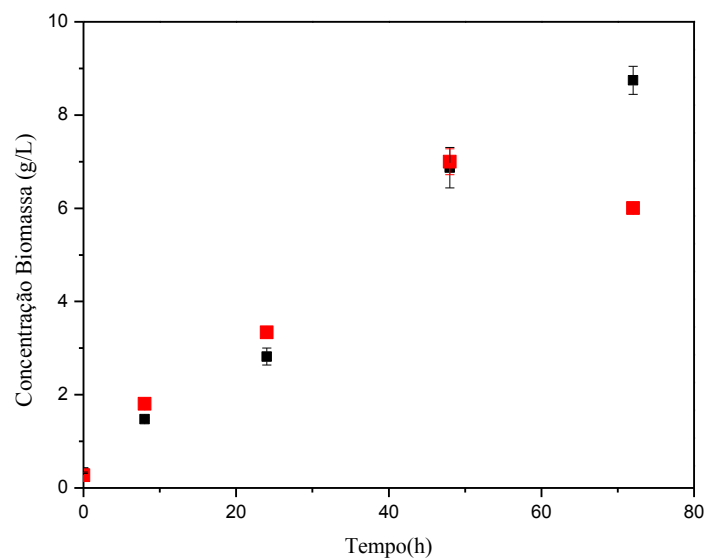


Figura 14 – Produção de lipase por *C. tropicalis* usando meio com resíduos: atividade extracelular, frascos (■), biorreator (■).

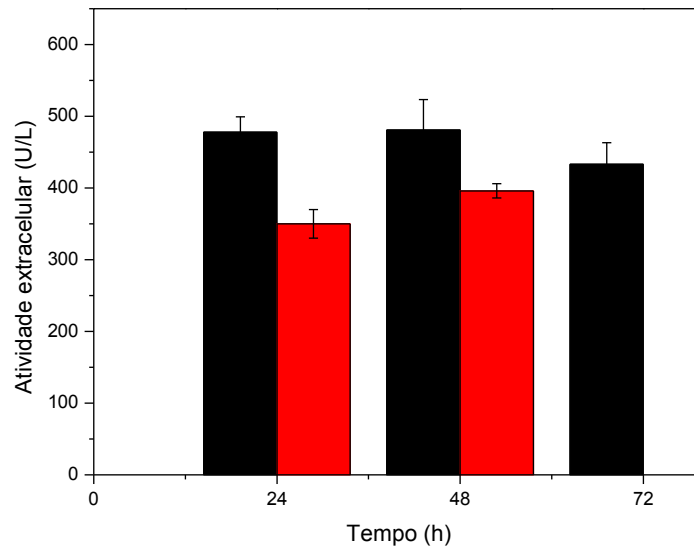
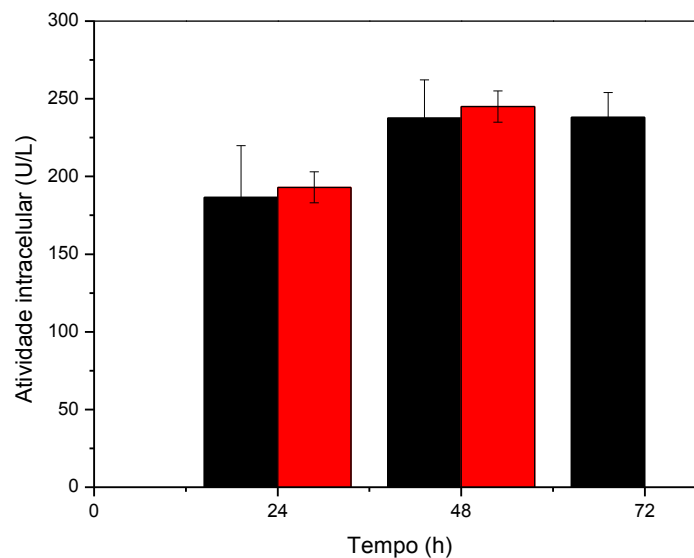


Figura 15 – Produção de lipase por *C. tropicalis* usando meio com resíduos: atividade intracelular, frascos (■), biorreator (■).



Observando as figuras para produção de lipases de *C. tropicalis* em meio sintético (Figura 12) e em meio com resíduos (Figuras 13, 14 e 15) para aproximadamente uma mesma concentração inicial de inóculo em ambos os casos, observa-se que em relação ao crescimento

celular e também a produção da enzima no meio sintético, foram menores em comparação as mesmas variáveis no meio com resíduos. Com relação ao tempo de cultivo observa-se que a enzima foi produzida a partir de 24 h até 48 horas de cultivo. Verifica-se também no meio sintético que o açúcar foi consumido até 28 horas, o que sugere que a célula se empregou, em um tempo posterior as 28 h, de outra fonte de carbono para produção da enzima, o OMW. Para o meio sintético, foi determinado a taxa de crescimento máxima para a levedura *C. tropicalis* que foi de $0,076 \text{ h}^{-1}$ (APÊNDICE 3).

Comparando a produção de *C. tropicalis* em meio com resíduos para as fermentações em frascos e em biorreator, verifica-se pela Figuras 13, que o crescimento da levedura em frascos e em biorreator foram similares, mas em biorreator a atividade extracelular da *C. tropicalis* foi maior em 48 h (próximo a 500 U/L) comparado ao dos frascos (próximo a 400 U/L). As atividades intracelulares (Figura 15) foram bem parecidas entre os dois tipos de cultivo. As atividades extracelulares (Figura 14) foram maiores em biorreator do que em frascos. A maior produção de lipase por *C. tropicalis* foi no cultivo em biorreator utilizando meio com resíduos mostrando o grande potencial de aplicabilidade desses materiais.

Comparando a produção em biorreator das leveduras *C. rugosa* e *C. tropicalis* no cultivo utilizando meio com resíduos (Figura 9 e Figura 13), observa-se pela Tabela 17, o consumo de açúcar das duas leveduras. A *C. rugosa* teve um consumo maior que o da *C. tropicalis*, além disso observa-se que o açúcar não foi consumido tão rapidamente como no meio sintético (Figura 12), porque como o melaço também possui sacarose, que é um dissacarídeo, em algum momento foi quebrada e produziu-se mais açúcares.

Tabela 17 –Análise do açúcar consumido pelas leveduras *C. rugosa* e *C. tropicalis* em cultivo de biorreator através da metodologia de DNS

Tempo (h)	<i>C. rugosa</i> (g/L)	<i>C. tropicalis</i> (g/L)
0	$6,2 \pm 0,31$	$5,8 \pm 0,22$
8	$5,6 \pm 0,35$	$5,2 \pm 0,02$
24	$3,6 \pm 0,16$	$4,7 \pm 0,30$
36	$2,5 \pm 0,13$	*
48	$1,7 \pm 0,05$	*
72	*	$3,1 \pm 0,19$

*Dados não determinados.

5.9 Caracterização da enzima produzida

5.9.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade da enzima produzida

5.9.1.1 *C. rugosa*

A Figura 16 mostra o efeito do pH sobre a lipase extracelular e intracelular. A atividade máxima foi observada a pH 7,0. Para valores de pH 4,0, 5,0, 8,0 e 9,0, a atividade da lipase foi baixa. A pH 6,0, os valores de atividade relativa foram cerca de 60%. Tendo em vista estes resultados, o valor do pH, para os experimentos seguintes, foi fixado em 7,0.

A Figura 17 mostra os resultados do efeito da temperatura sobre a atividade da lipase extracelular e intracelular. A atividade relativa máxima foi obtida em 40 °C. Pode ser observado também que atividade da lipase até a temperatura de 60 °C manteve-se acima de 70% da atividade relativa. Estes valores de pH e temperatura ótimos são similares aos de outros estudos de caracterização de lipase (DE MORAIS *et al.*, 2016; KUMARI E GUPTA, 2012; BUSSAMARA *et al.*, 2010). A forma do gráfico de temperatura da enzima lipase produzida por *C. rugosa* confirma provavelmente a produção de isoenzimas, por apresentar um ponto ótimo e outro próximo a ele. Esse resultado pode ser verificado na eletroforese pela presença de várias bandas próximas as referidas à lipase (Figura 20).

Figura 16 – Efeito do pH na atividade extracelular (■) e intracelular (●). Lipase produzida por *C. rugosa* em 24 h de cultivo em meio sintético. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade enzimática foi expressa em atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (590 U/L) e atividade intracelular (443 U/L).

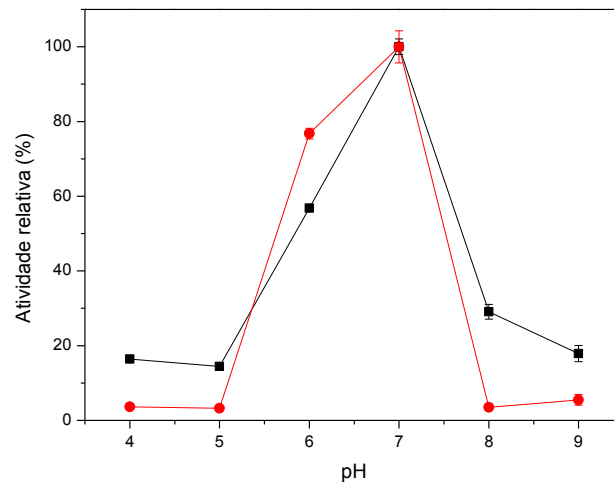
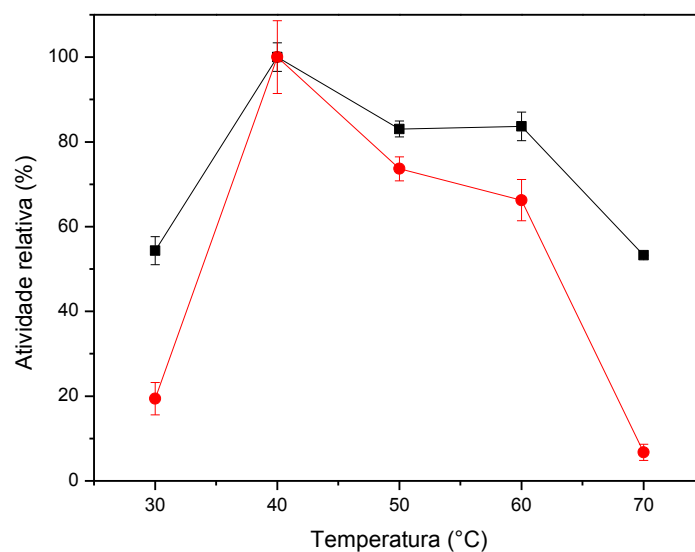


Figura 17 – Efeito da temperatura na atividade extracelular (■) e intracelular (●) da lipase. Lipase produzida por *C. rugosa* em 24 h de cultivo em meio sintético. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. A atividade enzimática foi expressa em atividade relativa (%). Atividade máxima extracelular (550 U/L) e atividade intracelular (330 U/L).



5.9.1.2 *Candida tropicalis*

A Figura 18 mostra o efeito do pH sobre a lipase extracelular e intracelular. A atividade máxima foi observada a pH 7,0. Para valores de pH 5,0, 6,0 e 9,0, a atividade da lipase foi baixa. A pH 8,0, os valores de atividade relativa foram acima de 60% da atividade total.

A Figura 19 mostra os resultados do efeito da temperatura sobre a atividade da lipase extracelular e intracelular. A atividade relativa máxima obtida foi em 70 °C para a extracelular e em 60 °C para intracelular. Essa enzima produzida é termotolerante e apresenta temperatura elevada igual as lipases produzidas por bactérias (DAOUD *et al.*, 2013, AISAKA *et al.*, 1980). Isso apresenta como uma vantagem para processos industriais nas quais proteínas comumente usadas são completamente desnaturadas (DELATORRE *et al.*, 2014).

Figura 18 – Efeito do pH na atividade extracelular (■) e intracelular (●). Lipase produzida por *C. tropicalis* em 24 h de cultivo em meio com resíduos. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. Atividade relativa (%) e atividade máxima extracelular (666 U/L) e atividade intracelular (503 U/L).

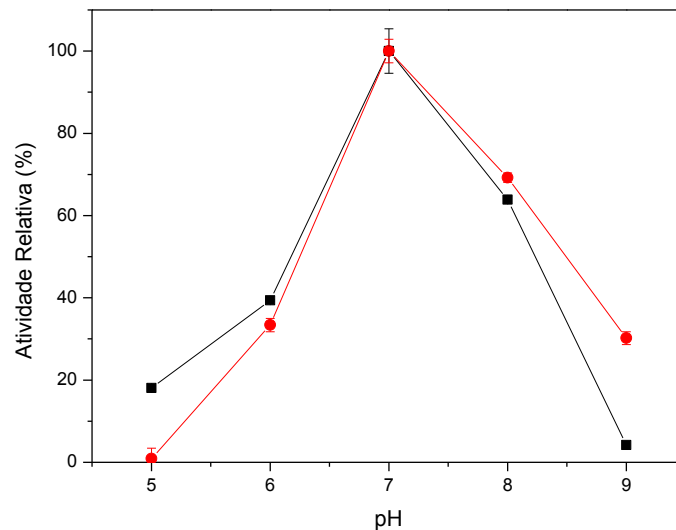
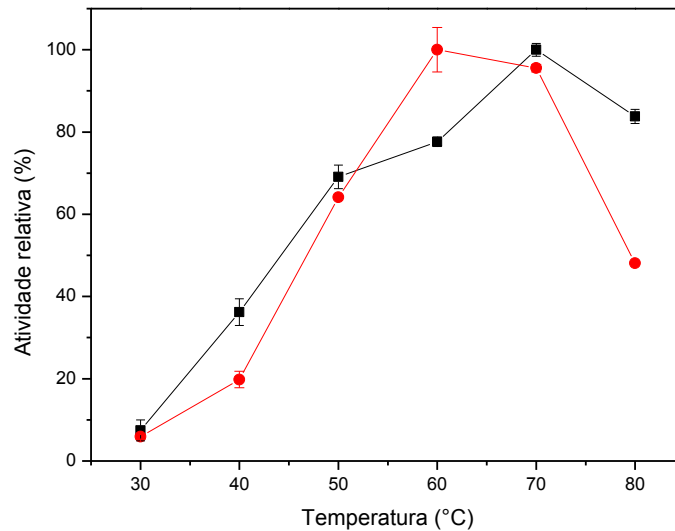


Figura 19 – Efeito da temperatura na atividade extracelular (■) e intracelular (●) da lipase. Lipase produzida por *C. tropicalis* em 24 h de cultivo em meio com resíduos. Resultados de uma média de experimentos em triplicata com desvio padrão. Atividade relativa (%) e atividade máxima extracelular (553 U/L) e atividade intracelular (457 U/L).



5.9.2 Eletroforese

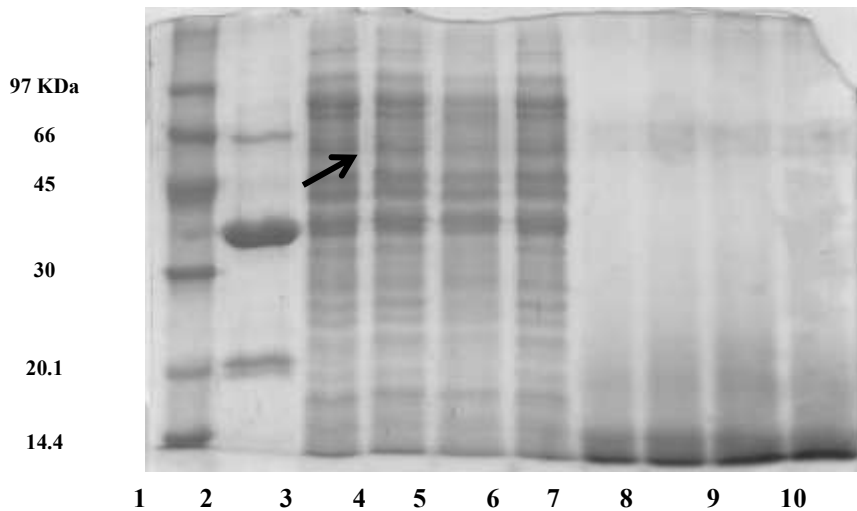
5.9.2.1 *C. rugosa*

A Figura 20 ilustra o gel de SDS-PAGE obtido para as diferentes amostras de lipase extracelular e intracelular produzidas por *C. rugosa* através do cultivo submerso utilizando meio com resíduos e purificação parcial em sulfato de amônia. Além disso, para fins de comparação, uma amostra comercial de lipase de *C. antarctica* (Sigma) foi incluída na eletroforese. Para essa enzima comercial, as bandas apresentaram massas molares aproximadas de 66 kDa, 37 kDa e 20 kDa (linha 2), sendo a banda da enzima em torno de 40 kDa (GUTARRA et al. (2011)). As outras bandas são contaminantes do extrato. A lipase intracelular de *C. rugosa* está presente da terceira à sexta linha (Figura 20), o que mostra um peso molecular aproximadamente igual de lipase de *C. rugosa* da Sigma (59 kDa), relatada anteriormente por De Moraes et al. (2016).

A lipase extracelular apresenta-se da sétima à décima linha, porém, neste caso, não foram apresentadas as bandas. Ficou ainda evidente na lipase intracelular a banda de 37 kDa como na enzima comercial de *C. antarctica* (linha 2). Isso mostra que o meio com

resíduos utilizado no cultivo submerso propiciou a produção da enzima lipase pela levedura *C. rugosa*.

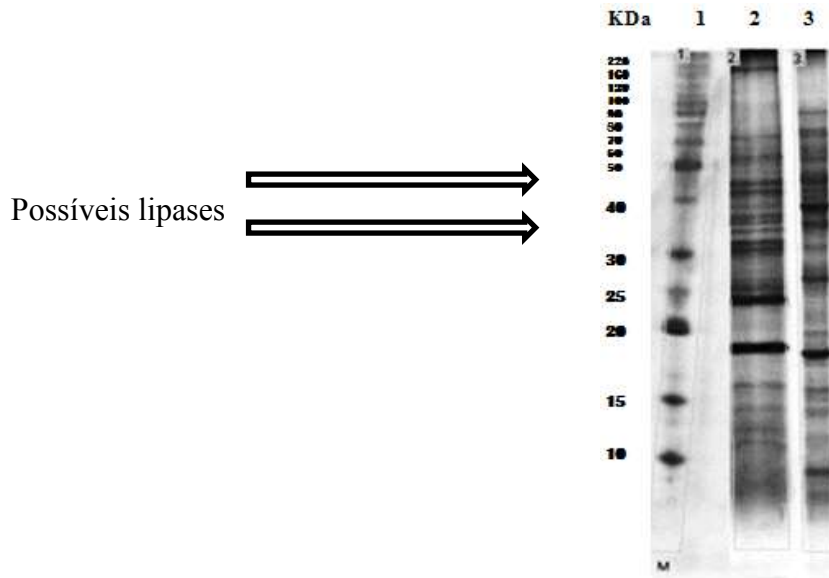
Figura 20 – Perfil eletroforético da lipase intracelular (linhas 3 a 6) e da lipase extracelular (linhas 7 a 10) produzida por *C. rugosa*.



5.9.2.2 *C. tropicalis* e *M. caribbica*

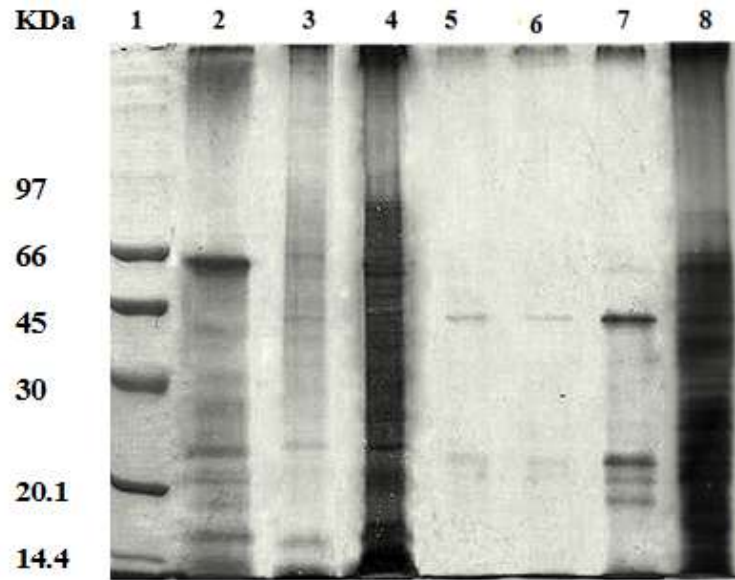
A Figura 21 ilustra o gel de SDS-PAGE apresentando os resultados obtidos para a eletroforese de extratos brutos de lipases produzidas pelas leveduras de *C. tropicalis* (linha 2) e *M. caribbica* (linha 3) em meio sintético. A *C. tropicalis* apresentou bandas entre 30 e 60 KDa, que podem ser lipases, e também outras bandas próximas à 22 KDa (APÊNDICE 4). A *M. caribbica* apresentou a produção de proteínas com bandas próximas a esses mesmos valores da levedura *C. tropicalis*, e também dentro da faixa de pesos moleculares da enzima lipase que é de 19 a 97 KDa (CYGLER e SCHRAG, 1997), mas não existem na literatura dados destas cepas fúngicas que mostre quais bandas se referem a lipase. Como já mostrado anteriormente a produção de lipase desta levedura foi em menor quantidade comparada a levedura *C. tropicalis*, por isso a caracterização foi realizada somente desta segunda.

Figura 21 – Perfil eletroforético da lipase intracelular, linhas 2 e 3, produzidas por *C. tropicalis* e *M. caribbica*, respectivamente.



Após a purificação da lipase de *C. tropicalis* em octil-agarose foi feita novamente uma eletroforese (Figura 22). Várias etapas do processo de purificação por adsorção foram avaliadas, com a finalidade de mostrar a eficácia do método e comprovar a produção da enzima de interesse pela levedura. Pôde-se observar na linha 7 da Figura 22, a presença de bandas em torno de 60 kDa, 45 kDa e outras acima de 22 kDa (APÊNDICE 5), acredita-se que estas são bandas características de lipase. Isso mostra que o método de isolar a enzima no suporte octil-agarose foi eficiente, pois o suporte teve maior afinidade pela a enzima lipase através da interação hidrofóbica (BARBOSA *et al.*, 2012a, VOLPATO *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2008). No processo de dessorção da enzima referida na solução de Triton (linhas 3, 5 e 6) o tempo de 96 horas não foi suficiente para dessorver toda a lipase pela metodologia utilizada, uma vez que a lipase ainda se apresentou adsorvida em octil-agarose (linha 7).

Figura 22 – Perfil eletroforético das lipases produzida por *C. tropicalis*. Linha 1: Marcador. Linha 2: *C. rugosa* comercial. Linha 3: Lipase extracelular recuperada com 1 % de Triton X-100. Linha 4: Sobrenadante do processo de adsorção da lipase em octil -agarose. Linha 5: Lipase Intracelular recuperada com 0,1 % de Triton X-100. Linha 6: Lipase Intracelular recuperada com 0,1 % de Triton X-100. Linha 7: Enzima lipase adsorvida em octil-agarose. Linha 8: Extrato inicial.



5.9.3 Processo de purificação

5.9.3.1 *C. rugosa*

O extrato enzimático produzido por *C. rugosa* foi precipitado por sulfato de amônio, logo após o precipitado foi ressuspendido em tampão fosfato de sódio 25 mM e passado em uma coluna *Sephadex* para a retirada do sal. Os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18 – Sumário do procedimento de purificação da lipase produzida por *C. rugosa*

Tempo (h)	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Fator de Purificação
Inicial	0,249	0,964	3,9	100	1
Precipitado por sulfato	0,101	0,741	7,3	77	1.9
Após dessalinização	0,043	0,565	13,1	59	3.4

Nos trabalhos de Abbas et al. (2002) e Kumar et al. (2005), os extratos enzimáticos foram submetidos a purificação com sulfato de amônio. Em Abbas et al. (2002), o rendimento da lipase foi de 99% após a precipitação com sulfato de amônio 75%, e o fator de purificação da enzima foi de 20,48. Em Kumar et al. (2005), a precipitação por sulfato de amônio foi seguida de uma dessalinização com tampão tris-HCL 0,1 M, resultando em um rendimento de 38%, e um fator de purificação foi de 16. Neste trabalho, o fator de purificação foi bem inferior (3,4) o que mostra que a purificação não foi eficiente, porque apesar da diminuição da concentração de proteínas no extrato (RIOS *et al.*, 2016), não foi suficiente para apresentar na eletroforese apenas bandas referentes a enzima lipases. Além disso, houve também uma perda considerável na atividade do extrato (0,399 U/mL), ocorrido possivelmente por desnaturação da lipase nas etapas de purificação.

5.9.3.2 *C. tropicalis*

Tendo em vista que a purificação do extrato de *C. rugosa* foi apenas parcial, pois na eletroforese (Figura 20) ainda apareceram inúmeras bandas que não são referentes a lipase. Optou-se então por fazer um novo tipo de purificação para a lipase produzida por *C. tropicalis* através da imobilização da enzima no suporte octil-agarose (Figura 22).

A enzima lipase (atividade inicial 528 U/L) foi adsorvida ao suporte de octil-agarose por 24 horas (atividade final 225 U/L), na eletroforese representada na linha 4 (Figura 22), que ainda pode ser vista uma banda de lipase. Nas linhas 3, 5 e 6 estão apresentadas as bandas próximas a 40 KDa, mostram os sobrenadantes após dessorção da enzima. A linha 7 representa o suporte octil-agarose após 96 horas de dessorção da enzima. É observado que a maior quantidade da enzima ainda se manteve no suporte (linha 7). O extrato inicial está apresentado ainda na linha 8 (Figura 22). Esse extrato possui toda a lipase inicial do extrato, e ainda pode ser representado pela soma das lipases presentes nas linhas 3, 5 e 7 (linha 6 é similar a linha 5).

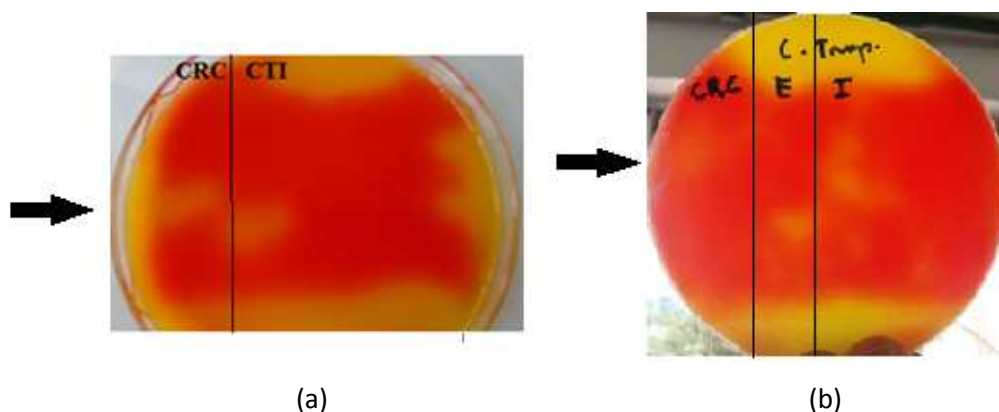
Na tentativa de purificação a imobilização da enzima produzida foi oportuna, uma vez que para aplicações industriais essa técnica é favorável, devido a facilidade de utilização da enzima e de sua recuperação (CAO, 2005). Existem muitos trabalhos na literatura que citam imobilização de lipases em suportes altamente hidrofóbicos formando por ligações não covalentes (BASTIDA *et al.*, 1998; FERNANDEZ-LORENTE, *et al.*, 2008).

Após a eletroforese e supostas bandas referentes a lipase da *C. tropicalis* necessitou-se ainda, uma comprovação através do zimograma, que somente a enzima nativa referente a lipase reage com o substrato e produz uma coloração diferente no gel.

5.9.4 Zimograma

A Figura 23 apresenta um zimograma, que mostra atividade da lipase frente ao substrato tributirina, uma vez que houve a mudança de coloração de acordo com a redução do pH nas linhas 2 (Figura 23-a) e nas linhas 2 e 3, (Figura 23-b). Na primeira linha de cada figura está a lipase comercial de *C. rugosa* (seta preta para destaque amarelo no gel), a coloração na Figura 23-a foi mais visível que na Figura 23-b. A enzima comercial tem a sua banda em 60 KDa (DE MORAIS *et al.*, 2016) e a lipase intracelular também apresentou banda próxima a 60 KDa (linha 2, Figura 23-a e linha 3, Figura 23-b) e na lipase extracelular bandas menores (linha 2, Figura 23-b), possivelmente 22 KDa devido a eletroforese (linha 3, Figura 22). Esse resultado mostra que a lipase de *C. tropicalis* possui bandas similares a lipase de *C. rugosa* comercial. As Figuras detalhadas estão no Apêndice 6.

Figura 23 – Zimograma contendo pNFL, como substrato, e *phenol red* (0,01 %), como agente revelador. Em ordem, estão: Lipase comercial de *Candida rugosa* (CRC) (linha 1) e de *Candida tropicalis* intracelular (CTI) (linha 2) (Figura 8-a); Lipase comercial de *C. rugosa* (linha 1), *C. tropicalis* E (linha 2), *C. tropicalis* I (linha 3) (Figura 8-b).



6.0. CONCLUSÃO

A *C. rugosa* foi capaz de produzir lipases em um meio alternativo contendo 5 g/L de melaço, 6 g/L de milhocina, 0,5% de OMW, 0,5 g/L de sulfato de amônio e 3 g/L de peptona. Este meio favoreceu a produção de lipase extracelular que exibiu uma atividade de 587 U/L, em contrapartida a atividade intracelular de 262 U/L. Estes resultados demonstram o potencial deste meio alternativo para a produção de lipase, com dois benefícios claros, quais sejam redução de custos de produção e diminuição de impacto ambiental. O cultivo em biorreator resultou em uma atividade de lipase extracelular ainda maior, o que revelou seu potencial para a produção da enzima industrial.

O meio de cultura contendo melaço, milhocina e águas residuais da produção de azeite (OMW) também foi adequado para a produção de lipase pelas leveduras *C. tropicalis* e *M. caribbica*. Para a levedura *M. caribbica*, a atividade do sobrenadante foi bem inferior à atividade produzida pela *C. tropicalis*.

A lipase produzida por *C. tropicalis* é similar à lipase de *C. rugosa*, apresentando o mesmo pH ótimo (pH 7.0) e bandas da eletroforese aproximadamente iguais (60 KDa, 45 KDa e 22 KDa). Com relação a temperatura ótima, a lipase de *C. tropicalis* (60 °C para intracelular) foi bem maior que a lipase produzida por *C. rugosa* (40 °C). Com o zimograma foi possível detectar qualitativamente a presença de lipase nos extratos extracelular e intracelular produzido por *C. tropicalis*. A levedura isolada por *C. tropicalis* URM 7057 apresentou-se como fonte promissora de produção da enzima lipase para o setor industrial.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H.; HIOL, A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp.* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 968–975, 2002.
- ABRUNHOSA, L.; OLIVEIRA, F.; DANTAS, D.; GONÇALVES, C.; BELO, I. Lipase production by *Aspergillus ibericus* using olive mill wastewater. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 3, p. 285-291, 2013.
- AISAKA, K.; TERADA, O. Purification and properties of lipoprotein lipase from *Rhizopus japonicus*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 799-805, 1980.
- AKOH, C. C.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. **Lipids**, v. 39, n. 6, p. 513-526, 2004.
- AKSHATHA, K. N.; MURTHY, S. M.; LAKSHMIDEVI, N. Purification and characterization of lipase from bacteria. **J Res Sci Technol**, v. 1, n. 7, p.19-27, 2011.
- ALONSO, F. O. M.; OLIVEIRA, E. B. L.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; PEREIRA-MEIRELLES, F. V. Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. **Journal of the Brazilian Sciences of Chemical Engineering**, v. 22, n. 7, p. 9–18, 2005.
- ASSES, N.; AYED L.; BOUALLAGUI, H.; BEN REJEB, I.; GARGOURI, M.; HAMDI, M. Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. **Bioresource technology**, v. 100, n. 7, p. 2182–2188, 2009.
- BARBOSA, A. M.; VENKATESAGOWDA, B.; MESSIAS, J. M.; ANDRADE, M. M.; DEKKER, R. F. **Soybean olive and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean olive to enhance the production of *botryosphaeran* by *Botryosphaeria rhodina***. INTECH Open Access Publisher. 2011.
- BARBOSA, O.; RUIZ, M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ, M.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2, 3, 4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports. **Process biochemistry**, v. 47, n. 5, p. 867-876, 2012.
- BASSEGODA, A.; CESARINI, S.; DIAZ, P. Lipase improvement: goals and strategies. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 2, n. 3, 2012.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, p. 486-493, 1998.

BAUTISTA-ROSALES, P. U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SERVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N. A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J. A. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. **Biological control**, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v. 14, n. 12, p. 1069-1087, 1998.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 167–170, 1995.

BERTRAM, M.; HILDEBRANDT, P.; WEINER, D. P.; PATEL, J. S.; BARTNEK, F.; HITCHMAN, T. S.; BORNSCHEUER, U. T. Characterization of lipases and esterases from metagenomes for lipid modification. **Journal of the American Olive Chemists' Society**, 85(1), 47-5, 2008. *Bioresour. Technol.*, v. 196, p. 364-375, 2015.

BORKAR, P. S.; BODADE, R. G.; RAO, S. R.; KHOBRADE, C. N. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* 96 SRT 9, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 358-366, 2009.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 255-266, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANCO, R. V.; GUTARRA, M. L.; GUISAN, J. M.; FREIRE, D. M.; ALMEIDA, R. V.; PALOMO, J. M. Improving the thermostability and optimal temperature of a lipase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by covalent immobilization. **BioMed research international**, 2015.

BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. Rio de Janeiro. Tese de Doutorado. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2010.

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

BROZZOLI, V., CROGNALE, S., SAMPEDRO, I., FEDERICI, F., D'ANNIBALE, A., PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3395-3402, 2009.

BÜCHS, J. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 7, n. 3, p. 91-98, 2001.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum sp.* using factorial design. **Bioresource technology**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; DE OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; VALENTE, P.; VAINSTEIN, M. H. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 268-275, 2010.

CALAM, C. T. Shake-flask fermentation, in: A.L. Demain, N.A. Solomon (Eds.), **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 58, 1986.

CAO L. Immobilised enzymes: science or art? **Curr Opin Chem Biol**, v. 9, p. 217–26, 2005.

CAPUTO, CARIN. **Avaliação da composição do meio de cultura para produção de lipase por *C. rugosa***. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. 2012.

CAVALCANTE, K. F. **Estudo da imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* em organo-gel para aplicação em síntese orgânica**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n. 2, p. 2871-2878, 2015.

CAVALCANTI, E. D. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. D. R.; SANT'ANNA JÚNIOR, G. L. Lipase production by solid-state fermentation in fixed-bed bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. SPE, p. 79-84, 2005.

CHEETHAM, P. S. J. **The applications of enzymes in industry**. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology, Ellis Horwood, p. 419–522, UK. 1995.

CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive olive. **Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 60-67, 2006.

COLEN, G.; JUNQUEIRA, R.G.; MORAES-SANTOS, T., Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna solive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 881-885, 2006.

COLLA, L. M.; REINEHR; C. O.; COSTA, J. A. V. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2013.

COUTO S.R; SANROMÁN M.A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302.

CUNHA, A. G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J. PAIVA, L. M. C.; FREIRE, D. M. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase - A comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, n. 1-3, p. 49–56, 2008.

CYGLER, M.; SCHRAG; J. D. Review: Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Quebec, v. 1441, p. 205-214, 1999.

CYGLER, M.; SCHRAG; J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in enzymology Lipases, Part A: Biotechnology**, New York, v. 284, p. 3-27, 1997.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1828–1833, 2006.

DAIHA, K. D. G.; ANGELI, R., DE OLIVEIRA, S. D.; ALMEIDA, R. V. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, 2015.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *C. rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9, p. 657-663, 2000.

DALMAU, E.; SÁNCHEZ, A., MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F. J.; CASAS, C. Study of the drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. **Journal of biotechnology**, v. 59, n. 3, p. 183-192, 1998.

DAOUD, L.; KAMOUN, J.; ALI, M. B.; JALLOULI, R.; BRADAI, R.; MECHICHI, T.; ...; ALOULOU, A. Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus sp.* extracellular lipase. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 232-237, 2013.

DASGUPTA, D.; GHOSH, P.; GHOSH, D.; SUMAN, S. K.; KHAN, R.; AGRAWAL, D.; ADHIKARI, D. K. Ethanol fermentation from molasses at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces sp.* IIPE453 and energy assessment for recovery. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 37, n. 10, p. 2019-2029, 2014.

DE ALBUQUERQUE; T. L.; DA SILVA JÚNIOR, I. J.; DE MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 11, p. 1779–1789, 2014.

DE ALMEIDA, A. F.; TAULK-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1225-1234, 2013.

DE MARIA, P. D.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 2, p. 180-196, 2006.

DE MORAIS, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; DE RESENDE, M. M. Optimization of the production and

characterization of lipase from *C. rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, v. 123, p. 26-34, 2016.

DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. **Perspectivas OnLine**, v. 4, n. 16, p. 2007-2010, 2014.

DELGENES, J. P.; ESCARE, M. C.; LAPLACE, J. M.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Biological production of industrial chemicals, ie xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. **Industrial Crops and Products**, v. 7, n. 2, p. 101-111, 1998.

DEY, P.; MAITI, M. K. Molecular characterization of a novel isolate of *Candida tropicalis* for enhanced lipid production. **Journal of applied microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1357-68, 2013.

EDWINOLIVER, N. G.; THIRUNAVUKARASU, K.; NAIDU, R. B.; GOWTHAMAN, M. K.; KAMBE, T.; KAMINI, N. R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6791-6796, 2010.

ERDMANN, H.; VORDERWÜLBECKE, T.; SCHMID, R.; KIESLICH, K. Comparison of lipase activities by different assays. **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering. Braunschweig: GBF Monographs**, p. 425-428, 1990.

ERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Amsterdam**, v. 44, p. 8-13, 2007.

ERTUGUL S.; DONMEZ G.; TAKAC S. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **J Hazard Mater**, v. 149, p. 720-724, 2007.

FABISZEWSKA, A. U.; KOTYRBA, D.; NOWAK, D.. Assortment of carbon sources in medium for *Yarrowia lipolytica* lipase production: A statistical approach. **Annals of microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1495-1503, 2015.

FADILOGLU, S.; ERKMEN, E. Effects of Carbon and Nitrogen sources on lipase production by *C. rugosa*. **Journal of Engineering and Environmental Science**, v. 26, p. 249-254, 2001.

FARIAS, C. M. M.; SOUZA, M.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MAGALHÃES, O. M. C. **Seleção de óleos vegetais para produção de lipases por culturas de *Geotrichum candidum***. Anais do I CONABIO – Congresso Nacional de Ciências Biológicas, Recife, PE – Brasil, 2012.

FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de micro-organismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 32, n. 1, p. 27-31, 2009.

- FENG, X.; PATTERSON, D. A.; BALABAN, M.; FAUCONNIER, G.; EMANUELSSON, E. A. C. The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. **Chemical engineering journal**, v. 221, p. 407-417, 2013.
- FERNANDES, I. A.; NYARI, N. L. D.; FICANHA, A. M. M.; PAULAZZI, A. R.; LEVANDOSKI, K.; ZENI, J.; DALLAGO, R. M. **Reações de síntese da Lipase B de *Candida antarctica* (CAL B) imobilizada em poliuretano**. Processos Biotecnológicos. Florianópolis-SC. COBEQ 2014.
- FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8-13, 2007.
- FERNANDEZ, L.; PEREZ-VICTORIA, I.; ZAFRA, A.; BENITEZ, P.L.; MORALES, J.C.; VELASCO, J.; ADRIO, J. L. High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris* protein. **Protein expression and purification**. v. 49, n. 2, p. 256– 264, 2006.
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; GUI SAN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061-1067, 2008.
- FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J. M.; Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 242–250, 2007.
- FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; SOLÀ, C. Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, n. 3, p. 221-255, 2001.
- FICKERS P, DESTAIN J, THORNART P. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. **FEMS Yeast Res**, v. 5, p. 527–543, 2005.
- FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. M. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 632-644, 2011.
- FICKERS, P.; NICAUD, J. M.; DESTAIN, J.; THONART, P. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 63, n. 2, p. 136-142, 2003.
- GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; HERNANDEZ, K.; DOS SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of styrene-

divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014.

GAUR, R.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Purification and characterization of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Process Biochem.** v. 43, p. 1040–1046, 2008.

GNANSOUNOU E.; VASKAN P.; PACHÓN E.R. Comparative techno-economic assessment and LCA of selected integrated sugarcane-based biorefineries. **Bioresource Technol**, v. 196, p. 364-375, 2015.

GODOY M. G.; GUTARRA M. L. E.; CASTRO A. M.; MACHADO O. L. T.; FREIRE D. M. G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 945–53, 2011.

GOMES, N.; GONÇALVES, C.; GARCÍA-ROMÁN, M.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. Optimization of a colorimetric assay for yeast lipase activity in complex systems. **Analytical Methods**, v. 3, n. 4, p. 1008-1013, 2011.

GONÇALVES, C.; LOPES, M.; FERREIRA, J. P.; BELO, I. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3759–3763, 2009.

GONÇALVES, C.; OLIVEIRA, F.; PEREIRA, C.; BELO, I. Fed-batch fermentation of olive mill wastewaters for lipase production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 8, p. 1215-1218, 2012.

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso**. Belo Horizonte, Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

GONZALEZ, G.W.; TORRES, E.F.; AGUILAR, C.N.; GOMEZ, S. J. R.; GODINEZ, G.D.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 157-167, 2003.

GRAMINHA E.B.N.; GONCALVES A.Z.L.; PIROTA R.D.P.B.; BALSALOBRE M.A.A.; SILVA R. D.; GOMES E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Anim Feed Sci Technol**, v. 144, p. 1–22, 2008.

GRBAVČIĆ, S.; BEZBRADICA, D.; IZRAEL-ŽIVKOVIĆ, L.; AVRAMOVIĆ, N.; MILOSAVIĆ, N.; KARADŽIĆ, I.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Production of lipase and protease from an indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strain and their evaluation as detergent additives: compatibility study with detergent ingredients and washing performance. **Bioresource technology**, v. 102, n. 24, p. 11226-11233, 2011.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced olive recovery and bioremediation. **Bioresource technology**, v. 177, p. 87-93, 2015.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; DE FREITAS, V.; AZEVEDO, Z.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. **Bioresource technology**, v. 212, p. 144-150, 2016.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S.; SAXENA, R.K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem olive, and its applications. **Pure & Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 251-262, 2005.

GUO X, OTA Y. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by a yeast (FO726A). **J Appl Microbiol**, v.89: p. 107–15, 2000.

GUO X.; TOMONAGA T.; YANAGIHARA Y, OTA Y. Screening for yeasts incorporating the exogenous eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from crude fish olive. **J Biosci Bioeng** v. 87, n. 2, p. 184-188, 1999.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 4, p. 518–526, 2007.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in lipid research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GUTARRA, M. L. E.; MATEO, C.; FREIRE, D. M. G.; TORRES, F. A. G.; CASTRO, A. M.; GUIBAN, J. M.; PALOMO, J. M. Oriented irreversible immobilization of a glycosylated *Candida antarctica* B lipase on heterofunctional organoborane-aldehyde support. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 260, 2011.

GUTARRA, M. L. E.; MATEO, C.; FREIRE, D. M. G.; TORRES, F. A. G.; CASTRO, A. M.; GUIBAN, J. M.; PALOMO, J. M. Oriented irreversible immobilization of a glycosylated *Candida antarctica* B lipase on heterofunctional organoborane-aldehyde support. **Catalysis Science & Technology**, v. 1, n. 2, p. 260, 2011.

HADEBALL, W. Production of Lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from Yeasts (Review). **Acta Biotechnologica**, v. 11, n. 2, p. 159-167, 1991.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: a comprehensive review. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

- HE, Y. Q.; TAN, T. W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida sp.* 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2006.
- HEIDTMANN, R. B.; DUARTE, S. H.; PEREIRA, L. P. D.; BRAGA, A. R. C.; KALIL, S. J. Kinetics and thermodynamic characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fractionated with ammonium sulphate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, p. 41-49, 2012.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M.M.; KÜGLER, J.H.; LOVAGLIO, R.B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochem.** v. 47, p. 1207–1219, 2012.
- HERNÁNDEZ-MONTAÑEZ, Z.; ARAUJO-OSORIO, J.; NORIEGA-REYES, Y.; CHÁVEZ-CAMARILLO, G.; VILLA-TANACA, L. The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 268, p. 178-186, 2007.
- HERNANDEZ-RODRIGUEZ B, CÓRDOVA J, BARZANA E, FAVELA-TORRES E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **J Mol Catal B:Enzym**, v. 61, n. 3, p. 136-142, 2009.
- HIOL, A.; JONZO, M. D.; DRUET, D.; COMEAU, L. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 80-87; 1999.
- HOPPE, A.; HEIMER, R. R. Titrimetric test for lipase activity using triolein emulsions. **Phytochemistry**, v. 42, p. 973-978, 1995.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 15, p. 29–63, 1994.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.
- JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.
- JUNQUEIRA, C. M. **Partição da Lipase de *Geotrichum candidum* em sistemas aquosos bifásicos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
- JURADO, E.; BRAVO, V.; LUZON, G.; FERNANDEZ-SERRANO, M.; GARCIA-ROMAN, M.; ALTMAJER-VAZ, D.; VICARIA, J.M. Hard-surface cleaning using

lipases: enzyme– surfactant interactions and washing tests. **J. Surfactants Deterg.** V. 10, p. 61–70, 2007.

KANNAPPAN, V.; SANTHI, B. S. Ultrasonic investigation stability of *Candida rugosa* lipase. **Indian Journal of Pure and Applied Physics**, v. 51, n. 11, p. 749–757, 2013.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555-569, 2012.

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZEWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, n. 1, p.186-191, 2012.

KAPUCU, H.; GÜLSOY, N.; MEHMETOĞLU, Ü. Disruption and protein release kinetics by ultrasonication of *Acetobacter peroxydans* cells. **Biochemical engineering journal**, v. 5, n. 1, p. 57-62, 2000.

KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3, p. 121-126, 2006.

KIM, B. S.; KIM, H. R.; HOU, C. T. Effect of surfactant on the production of oxygenated unsaturated fatty acids by *Bacillus megaterium* ALA2. **New biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 33-37, 2010.

KNORR, D.; ZENKER M.; HEINZ V; LEE D. Applications and potential of ultrasonics in food processing, **Trends Food Sci. Tech.**; p. 261–266, 2004.

KONWARH, R.; PRAMANIK, S.; KALITA, D.; MAHANTA, C. L.; KARAK, N. Ultrasonication - A complementary “green chemistry” tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 2, p. 292–299, 2012.

KOSKINEN A. M. P.; KLIBANOV A. M. **Enzymatic Reactions in Organic Media**. 1st ed. Blackie Academic and Professional Publisher, 1996.

KRASTANOV, A.; GOVINDARAJAN, A.; DANIEL, D. Studies on lipase fermentation using *Candida cylindracea* NRRL y-17506 in a stirred tank bioreactor. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 14, n. 3, p. 290-299, 2008.

KUMAR, R.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SINGH, D. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. **New biotechnology**, v. 28, n. 1, p.65-71, 2011.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS – 3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38–44, 2005.

KUMARI, A.; GUPTA, R. Extracellular expression and characterization of thermostable lipases, LIP8, LIP14 and LIP18, from *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology letters**, (9), p. 1733–1739, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAZAR, I.; LAZAR, I. (2010). GelAnalyzer 2010a: Freeware 1D Gel Electrophoresis Image Analysis Software.

LEE, D. G.; PONVEL, K. M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I. S.; LEE, C. H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1, p. 62-66, 2009.

LEE, G. H.; BAE, J. H.; SUH, M. J.; KIM, I. H.; HOU, C. T.; KIM, H. R. New finding and optimal production of a novel extracellular alkaline lipase from *Yarrowia lipolytica* NRRL Y-2178. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 6, p. 1054-1057, 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Eds.). Processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3, p. 1-43, 2001.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S. C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 98-102, 2006.

LINFIELD, W. M.; S EROTA, S.; SIVIERI, L. Lipid – lipase interactions. 2. a new method for the assay of lipase activity. **J. Am. Olive Chem. Soc.**; v. 62, p. 1152-1154, 1985.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2. 3 with potential application for the hydrolysis of edible olives. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p.445-451, 2008.

LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J. L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *C. rugosa* lipase. **Chemistry and physics of lipids**, v. 93, n. 1, p.143-148, 1998.

MADDIPATI, P.; ATIYEH, H. K.; BELLMER, D. D.; HUHNKE, R. L. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresour. Technol.** v. 102, p. 6494–6501, 2011.

MAHADIK, N. D. et al. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715- 721, 2002.

MALDONADO, R. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; POZZA, E. L.; COSTA, F. A. A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Production of lipase from *Geotrichum candidum* using corn steep liquor in different bioreactors. **Journal of the American Olive Chemists' Society**, v. 91, n. 12, p. 1999-2009, 2014.

- MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in Shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147-151, 2012.
- MANOEL, E. A.; DOS SANTOS, J. C.; FREIRE, D. M.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and microbial technology**, v. 71, p. 53-57, 2015.
- MARIMUTHU, K. Isolation and characterization of *Staphylococcus hominis* JX961712 from olive contaminated solive. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 3, p. 252-256, 2013.
- MARTINELLE M, HULT K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. **Biochim Biophys et Acta** v. 1251, p. 191–197, 1995.
- MARTINS, V.G.; KALIL, S.J.; COSTA, J.V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química nova**, v. 31, p. 1942-1947, 2008.
- MATTANOVICH, D.; GASSER, B.; HOHENBLUM, H.; SAUER, M. Stress in recombinant protein producing yeasts. **J. Biotechnol.** v. 113, p. 121–135, 2004.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MENESES, D. P.; GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, F.; GONÇALVES, L. R.; RODRIGUES, L. R.; RODRIGUES, S. The yeast-like fungus *Aureobasidium thailandense* LB01 produces a new biosurfactant using olive oil mill wastewater as an inducer. **Microbiological Research**, 2017.
- MESSIAS, J. M.; DA COSTA, B. Z.; DE LIMA, V. M. G.; GIESE, E. C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213-234 2011.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONTESINOS J. L, OBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *C. rugosa*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 25–37, 1996.
- MONTESINOS, J. L.; DALMAU, E.; CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *C. rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 7, p. 753-761, 2003.

MORRISSEY, J. H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Anal Biochem**, v. 117, p. 307-310, 1981.

MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R.; NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 9, n. 1, p. 17-23, 2001.

MUSSATTO, S. I. Biotechnological potential of brewing industry by-products. In: Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. **Springer Netherlands**, p. 313-326.; 2009.

MUSTRANTA, A. Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 1992.

NOOR, I. M.; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. B. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of lipase by *Candida cylindracea* 2031 in batch fermentation. **In Proceedings of the 1st International conference on Natural Resources Engineering and Technology**, p. 158-166, 2006.

OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. Effects of different fatty acids in lipase production by *C. rugosa*. **Biotechnology letters**, v. 15, n. 4, p. 357-360.

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

OLLIS D. L, CHEAH E.; CYGLER M.; DIJKSTRA B.; FROLOW F.; FRANKEN S. M. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Eng**, v. 5: p. 197-221, 1992.

OYANE, I.; TAKEDA, T.; ODA, Y.; SAKATA, T.; FURUTA, M.; OKITSU, K.; ... NISHIMURA, R. Comparison between the effects of ultrasound and γ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Analyses of cell membrane permeability and DNA or RNA synthesis by flow cytometry. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 16, n. 4, p. 532-536, 2009.

OZBEK, B.; ULGEN, K. O. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1037-1043, 2000.

PACHECO, A. M. **Estudo da viabilidade da produção de etanol a partir de suco de caju (*Anacardium occidentale L.*) utilizando células imobilizadas em bagaço de caju**. Fortaleza, Dissertação de Mestrado. Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará. 2016.

PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu olive production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 84-86, p. 1137-1145, 2000.

- PANDEY A, SOCCOL C. R.; MITCHELL D. New developments in solid state fermentation I- bioprocesses and products. **Process Biochem**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.
- PANDIT, A. B.; HARRISON, S.; FARKADE, V. D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochem. Eng. Journal**, v.23, p. 247, 2005.
- PANTOJA, D. C. S.; CAVALCANTE, L. S.; MESQUITA, S. A.; DE FREITAS, M. F. M.; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L.R.B. **Production of lipase by yeasts isolated from agroindustrial wastes**. In: 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Fortaleza - CE. Proceedings of the 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition, v. 1. p. 1-1, 2014.
- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.
- PEIRCE, S.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; RUEDA, N.; BARTOLOME-CABRERO, R.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; ... FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Development of simple protocols to solve the problems of enzyme coimmobilization. Application to coimmobilize a lipase and a β -galactosidase. **RSC Advances**, v. 6, n. 66, p. 61707-61715, 2016.
- PERRY, K. S. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PILLI, S.; BHUNIA, P.; YAN, S.; LEBLANC, R. J.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Ultrasonic pretreatment of sludge: a review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2011.
- PINHEIRO, A. D. T. **Viabilidade técnica e econômica da produção de etanol a partir do suco de caju por *Saccharomyces cerevisiae* flocculante**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 2015.
- PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; et al. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444–450, 2008.
- PLOU, F. J.; FERRER, M.; NUERO, O. M.; CALVO, M. V.; ALCALDE, M.; REYES, F. BALLESTEROS, A. Analysis of Tween 80 as an esterase/lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology techniques**, v. 12, n. 3, p.183-186, 1998.
- POTUMARTHI, R.; SUBHAKAR, C.; VANAJAKSHI, J.; JETTY, A. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, p. 700–710. 2008.

PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 287–294, 2006.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Optimization of medium composition for lipase production by *C. rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 643-655, 2007.

REDONDO, O.; HERRERO, A.; BELLO, J. F.; ROIG, M. G.; CALVO, M. V.; PLOU, F. J.; BURGUILLO, F. J. Comparative kinetic study of lipases A and B from *C. rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1243, n. 1, p. 15-24, 1995.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M. D.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme research**, 2011.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 7, p. 1132-1137 2010.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; DOS SANTOS, J. C. S.; FONSECA, T. D. S.; LIMA, L. D.; DE MATTOS, M. C.; ...; GONÇALVES, L. R. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R, S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p.246-258, 2016.

RODRIGUES, R. C.; BOLIVAR, J. M.; PALAU-ORS, A.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. Positive effects of the multipoint covalent immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 6, p. 386-393, 2009.

ROONEY D, WEATHERLEY LF. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower olive in a stirred liquid–liquid reactor. **Process Biochem**, v. 36, p. 947–53, 2001.

RUCHI, G.; ANSHU, G.; KHARE, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 11, p. 4796-4802, 2008.

RUEDA, N.; DOS SANTOS, J. C.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. **RSC Advances**, v. 5, n. 15, p. 11212-11222, 2015.

SÁ, T. N. M. **Produção de esterases por leveduras e fungos isolados de resíduos agroindustriais**. XIX SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 30 de julho-02 de agosto de 2013, Foz de Iguaçu, PR, Brasil.

SAEKI, K.; OZAKI, K.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. **J. Biosci. Bioeng.** v. 103, p. 501–508, 2007.

SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm olive mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1, p. 66-73, 2012.

SANGORRÍN, M. P.; MARTONE, C. B.; SÁNCHEZ, J. J. Identification of a myofibril-bound serine protease and its endogenous inhibitor in mouse skeletal muscle. **Int. Journal Biochemical. Cell Biol.** v. 32, p. 1213–1222, 2000.

SANTOS, D. K.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SALGUEIRO, A. A.; SARUBBO, L. A. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43-50, 2013.

SCHMID T F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 68, p. 425–435, 2005.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; SOREGAROLI, C.; VARINELLI, D.; MORRONE, R. Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 157-163, 2001.

SHARMA, A.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Enzymatic hydrolysis of cod liver olive for the fatty acids production. **Catalysis Today**, v. 207, p. 93–100, 2013.

SHARMA, M.; PATEL, S. N.; LATA, K.; SINGH, U.; KRISHANIA, M.; SANGWAN, R. S.; SINGH, S. P. A novel approach of integrated bioprocessing of cane molasses for production of prebiotic and functional bioproducts. **Bioresource technology**, v. 219, p. 311-318, 2016.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras em placas**. In: Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, p. 21-29, 1997.

SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P. W.; FARINAS, C. S. Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 4, p. 558-571, 2016.

SINGH, R.; GUPTA, N.; GOSWAMI, V. K.; GUPTA, R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 679-682, 2006.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p.205-218, 2003.

SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres.** Fortaleza, Dissertação de Doutorado. Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, 2013.

SUZZI, G.; LANORTE, M. T.; GALGANO, F.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E. Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. **International journal of food microbiology**, v. 69, n. 1, p. 69-77, 2001.

TAKAÇ, S.; ÜNLÜ, A. E.; ERDEM, B. Oxygen transfer strategy modulates the productions of lipase and esterase enzymes by *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 3, p. 150-154, 2010.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida sp* and lipase production by fermentation. **Process. Biochem.** v. 39, p. 459-469, 2003.

TOMMASO, G.; MORAES, B. S.; MACEDO, G. C.; SILVA, G. S.; KAMIMURA, E. S. Production of lipase from *Candida rugosa* using cheese whey through experimental design and surface response methodology. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, n. 8, p. 1473 – 1481, 2010.

TREICHEL, H.; DE OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. **Food and bioprocess technology**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

TSUJITA, T.; NAKAGAWA, A.; SHIRAI, K.; SAITO, Y.; OKUDA, H. Methyl butyrate- hydrolyzing activity of hepatic triglyceride lipase from rat post-heparin plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 11215-11220, 1984.

UCHOA, A. M. A.; COSTA, J. M. C.; MAIA, G. A.; SILVA, E. M. C.; CARVALHO, A. F. F. U.; MEIRA, T. R. Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 58-65, 2008.

VAKHLU, J.; KOUR A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69-85, 2006.

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B. Study of the surfactant properties of aqueous stream from the corn milling industry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 24, p. 5451-5457, 2014.

VEERARAGAVAN K.; COLPITTS T.; GIBBS B.F. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1044, n. 1, p. 26-33, 1990.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 2, p. 161-169, 2008.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 9, n. 4, p. 113-148, 2000.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; HIRATA, D. B.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and microbial technology**, v. 96, p. 30-35, 2017.

VOLPATO, G. **Produção, purificação e imobilização de lipases**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

WANG, L.; CHI, Z.; WANG, X.; LIU, Z.; LI, J. Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and olive hydrolysis by their crude enzymes. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 495-501, 2007.

WATANABE N, OTA Y, MINODA Y, YAMADA K. Studies on alkaline lipases from *Pseudomonas* species. Part I: Isolation and identification of alkaline lipase producing micro-organisms, cultural conditions and some properties of the crude enzymes. **Agric Biol Chem.**; v. 41: p. 1353–8, 1977.

WEI, D.; ZHANG, L. Y.; SONG, Q. Studies on a novel carbon source and cosolvent for lipase production by *C. rugosa*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 133-136, 2004.

WISEMAN. A. Handbook of Enzyme Biotechnology, 3^a ed., Ellis Horwood: London, 1995.

WU, C.; LIU, X.; LI, Y.; DU, X.; WANG, X.; XU, P. Lipase-nanoporous gold biocomposite modified electrode for reliable detection of triglycerides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 53, p. 26-30, 2014.

WU, J. Y.; YEH, K. L.; LU, W. B.; LIN, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1157-1164, 2008.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2095-2103, 2005.

ZHANG W, SINHA J, SMITH LA, INAN M, MEAGHER MM. Maximization of production of secreted recombinant proteins in *Pichia pastoris* fed-batch fermentation. **Biotechnol Prog**, v. 21: p. 386–393, 2005.

ZHANG, Z.; SU, B.; WU, M.; LIN, J.; YANG, L. Strategies for eliminating l-arabinitol in the bioconversion of xylitol. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 1964-1972, 2016.

ZHAO, W.; WANG, J.; DENG, R. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 189-195, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Tabela 1 – Anova: fator único para atividade extracelular meios B e C (Análise de variância Tabela 11)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	204.1667	1	204.1667	0.995126	0.37495	7.708647
Dentro dos grupos	820.6667	4	205.1667			
Total	1024.833	5				

Tabela 2 – Anova: fator único para atividade intracelular meios A e C

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0.220417	1	0.220417	0.00430771	0.950819	7.708647
Dentro dos grupos	204.6717	4	51.16792			
Total	204.8921	5				

Tabela 3 – Anova: fator único para atividade intracelular meios B e C

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	782.0417	1	782.0417	11.79698	0.026422	7.708647
Dentro dos grupos	265.1667	4	66.29167			
Total	1047.208	5				

Tabela 4 – Anova: fator único para açúcar residual meios B e C

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	7.590025	1	7.590025	204.9973	0.004843	18.51282
Dentro dos grupos	0.07405	2	0.037025			
Total	7.664075	3				

APÊNDICE 2

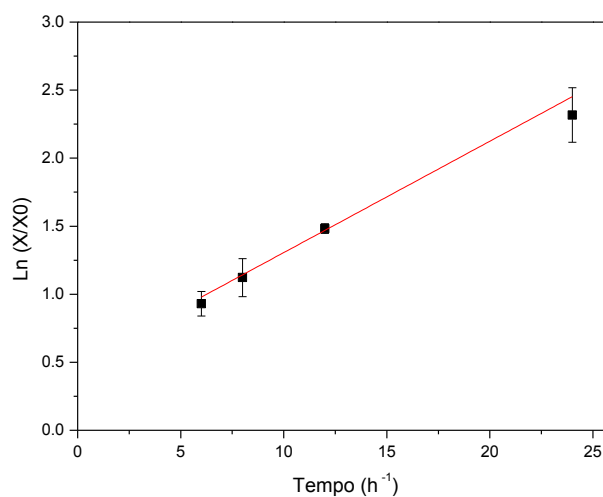
Tabela 13 – Atividade intracelular e proteína produzida pela *C. tropicalis* utilizando- 4 meios alternativos em 24 h e 48 h (referente Figura 5)

Meio	Atividade intracelular (U/L)		Proteína intracelular (g/L)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1	-	-	0,239 ± 0,01	0,467 ± 0,00
2	-	-	1,070 ± 0,04	0,876 ± 0,01
3	-	-	0,553 ± 0,00	0,755 ± 0,00
4	110 ± 10,0	140 ± 0,0	1,220 ± 0,11	1,740 ± 0,57

Tabela 14 – Atividade intracelular e proteína produzida pela *M. caribbica* utilizando 4 meios alternativos em 24 h e 48 h (referente Figura 6)

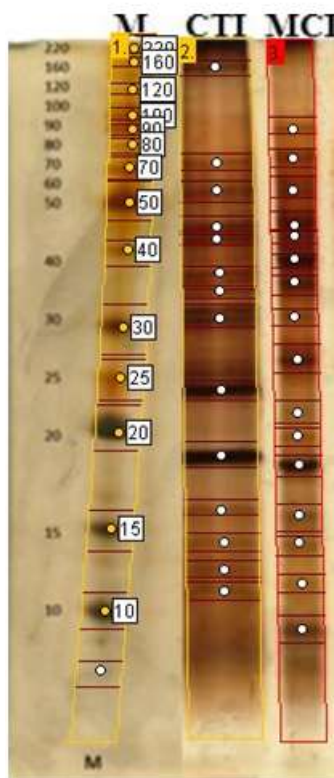
Meio	Atividade intracelular (U/L)		Proteína intracelular (g/L)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1	-	-	1,182 ± 0,10	1,135 ± 0,12
2	-	165 ± 10	1,445 ± 0,26	1,487 ± 0,55
3	-	-	1,269 ± 0,09	1,943 ± 0,05
4	154 ± 13	117 ± 9	1,302 ± 0,06	1,035 ± 0,02

APÊNDICE 3

Gráfico 1 – Gráfico de $\ln(x/x_0)$ versus tempo. Taxa máxima de crescimento igual a 0.076 h^{-1} e $R_2 = 0.99303$.

APÊNDICE 4

Figura 1– Análise da Figura 21 (linhas 2 e 3, produzidas por *C. tropicalis* e *M. caribbica*, respectivamente) pelo o programa *Gelanalyzer* (acesso em nov/16).



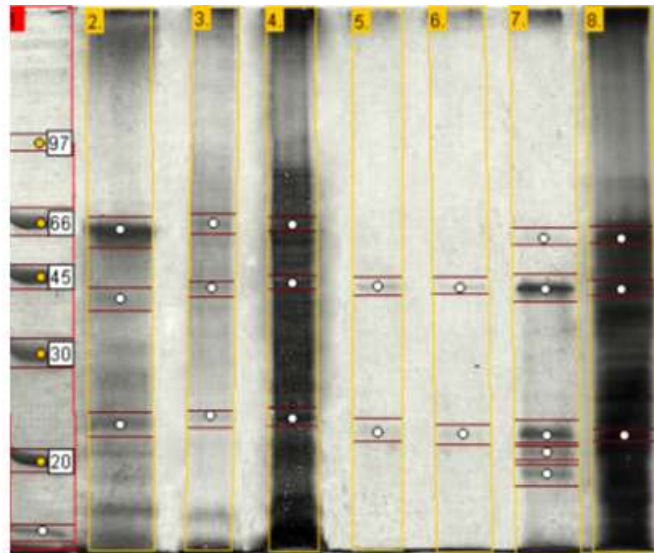
Dados registrados pelo o programa referente a Figura 1

Coluna	banda	RF	Intensidade	MW
1.	1.	0.023	958	220
1.	2.	0.042	611	160
1.	3.	0.08	701	120
1.	4.	0.116	911	100
1.	5.	0.135	910	90
1.	6.	0.158	1006	80
1.	7.	0.19	1518	70
1.	8.	0.238	2755	50
1.	9.	0.305	1504	40
1.	10.	0.415	2829	30
1.	11.	0.486	2146	25
1.	12.	0.563	2778	20
1.	13.	0.698	2351	15
1.	14.	0.814	2252	10
1.	15.	0.897	1106	19
2.	1.	0.042	1368	175
2.	2.	0.179	1289	67
2.	3.	0.218	1788	53
2.	4.	0.269	1504	41
2.	5.	0.286	1181	38
2.	6.	0.334	1854	32
2.	7.	0.36	882	29

Coluna	banda	RF	Intensidade	MW
2.	8.	0.399	2188	26
2.	9.	0.5	2063	22
2.	10.	0.594	2305	20
2.	11.	0.672	1230	20
2.	12.	0.718	1388	19
2.	13.	0.756	1337	19
2.	14.	0.786	1506	19
3.	1.	0.127	1121	94
3.	2.	0.169	1480	71
3.	3.	0.214	1718	55
3.	4.	0.263	1667	42
3.	5.	0.279	1080	39
3.	6.	0.312	1353	34
3.	7.	0.344	1731	31
3.	8.	0.393	1163	27
3.	9.	0.455	2310	23
3.	10.	0.529	1400	21
3.	11.	0.562	1185	0
3.	12.	0.604	1735	20
3.	13.	0.675	1769	20
3.	14.	0.714	1323	19
3.	15.	0.773	1140	19
3.	16.	0.838	2025	19

APÊNDICE 5

Figura 1- Análise da Figura 22 (linhas 2 e 3, produzidas por *C. rugosa* e *C. tropicalis*, respectivamente) pelo o programa *Gelalyzer* (acesso em fev/17).



Dados registrados pelo o programa referente a Figura 1

Coluna	Banda	RF	Intensidade	MW
1.	1.	0.251	207	97
1.	2.	0.398	2586	66
1.	3.	0.499	2852	45
1.	4.	0.64	1706	30
1.	5.	0.836	1967	20
1.	6.	0.965	474	14
2.	1.	0.409	2065	61
2.	2.	0.535	327	42
2.	3.	0.768	660	22
3.	1.	0.401	146	62
3.	2.	0.518	170	44
3.	3.	0.752	302	23
4.	1.	0.401	47	62
4.	2.	0.508	116	46
Coluna	Banda	RF	Intensidade	MW

4.	3.	0.755	370	23
5.	1.	0.513	374	45
5.	2.	0.781	284	22
6.	1.	0.515	258	45
6.	2.	0.783	137	22
7.	1.	0.424	121	58
7.	2.	0.516	2165	45
7.	3.	0.781	1271	22
7.	4.	0.813	411	20
7.	5.	0.851	475	18
8.	1.	0.425	163	58
8.	2.	0.518	89	44
8.	3.	0.785	26	21

APÊNDICE 6

Figura 21 – Fotos completas da Figura 23.

Figura a

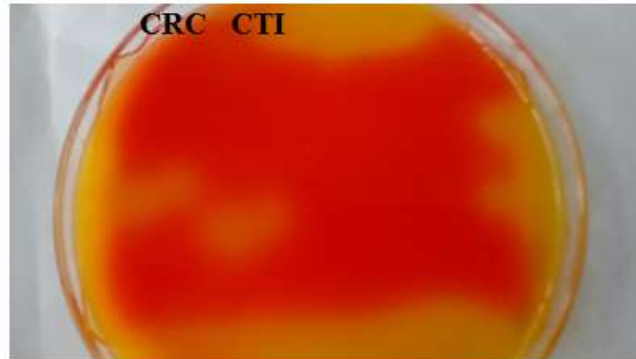


Figura b

