

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

***SELEÇÃO DE LEVEDURAS LIPOLÍTICAS ISOLADAS DE BROMÉLIAS E  
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE BRUTA DE *Debaryomyces  
melissophilus* BI81***

**Luiza Lux Lock  
Química Industrial - UNISC**

Porto Alegre,  
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

***SELEÇÃO DE LEVEDURAS LIPOLÍTICAS ISOLADAS DE BROMÉLIAS E  
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPASE BRUTA DE *Debaryomyces  
melissophilus* BI81***

**Luiza Lux Lock  
Química Industrial - UNISC**

Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente na  
área de Microbiologia Industrial

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Fevereiro de 2007

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos professores Patrícia Valente e Valeriano Corbellini pela orientação, apoio, paciência e carinho nestes dois anos de estudo. Obrigada por dividirem comigo um pouco de seus conhecimentos!

A minha família, principalmente a minha mãe, irmã e avô, pelo apoio, carinho, incentivo e paciência nos momentos difíceis. Vocês tornaram esta conquista possível, me acompanhando com amor e compreensão a cada dia. Amo vocês!

Aos meus amigos queridos, tanto os de longa data, como a Grazy, a Deise, a Karola, o Luis Leitão, a Roberta e a Indara, quanto os mais recentes, como a Débora, a Nids, a Doca e a Tatá, que souberam entender minha ausência e me deram força pra continuar quando enfrentei fases de desânimo e tensão.

As minhas ex-colegas de graduação, Fabi, Lucélia, Carol e Carina. Sempre presentes, trocando idéias, dando força e motivação! Os cinco anos que passamos juntas no curso de Química Industrial vão ficar para a história!

Aos meus colegas de mestrado, Ana, Tais, Daniele, Daniel e Fernanda, pessoas maravilhosas que entraram na minha vida como simples colegas de curso e hoje tenho como grandes amigos. Obrigada pelo apoio, pela compreensão, pelo companheirismo, pelas risadas e pela hospitalidade. Enfim, vocês são maravilhosos!

Aos colegas e professores da Unisc, do departamento de Química e Física, que abriram as portas da Instituição para que eu pudesse desenvolver o projeto.

A Luciane Gobbi, responsável pelos laboratórios de biologia, por possibilitar meu acesso a equipamentos e materiais que se encontram sob sua responsabilidade.

A colega Melissa Landell por me fornecer as leveduras isoladas e caracterizadas em seu projeto de mestrado, me passando as informações necessárias sempre que precisei.

As minhas filhinhas peludas, que me alegraram e me deram carinho entre uma “dissertada” e outra.

Ao meu namorado Luis, que participou apenas do final da minha luta pelo título de mestre, mas certamente me ajudou com muito amor na fase mais difícil e decisiva do curso.

# SELEÇÃO DE LEVEDURAS LIPOLÍTICAS ISOLADAS DE BROMÉLIAS E PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE BRUTA DE *Debaryomyces melissophilus* B181

Autor: Luiza Lux Lock

Orientador: Patrícia Valente

## RESUMO<sup>1</sup>

As leveduras, devido a sua versatilidade, facilidade de cultivo, menor propensão à contaminação e por oferecerem menor risco à saúde pública, têm sido alvo de inúmeras pesquisas direcionadas à produção de enzimas para aplicação em processos industriais. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade catalítica de lipases produzidas por leveduras isoladas de folhas de bromélias no Parque de Itapuã visando sua aplicação na biossíntese de ésteres. Realizou-se a triagem das leveduras através das técnicas: crescimento em Tween 80 como única fonte de carbono, fluorimetria utilizando rodamina B e crescimento em meio de cultura contendo cloreto de cálcio. Para a levedura selecionada como melhor produtora lipase, foi feita a curva de crescimento e a caracterização da enzima. Após, a enzima foi submetida ao ensaio de imobilização em poliestireno comercial e em polipropileno poroso (sintetizado durante a pesquisa). Finalmente, foram selecionadas amostras de leveduras que apresentaram atividade lipolítica significativa e uma amostra de baixa atividade para a realização do ensaio de correlação entre o espectro de FT-IR da biomassa microbiana cultivada com ou sem rodamina B e a atividade lipolítica medida através de titrimetria. Verificou-se que leveduras isoladas de bromélias do parque de Itapuã, RS são boas fontes de lipases microbianas. A levedura *Debaryomyces melissophilus* B181 foi selecionada como a melhor produtora de lipase extracelular, a qual possui características de uma lipase neutra mesofílica com dependência de fatores nutricionais semelhante à *Candida* sp e com baixa estabilidade frente aos solventes de transesterificação metanol e etanol, porém com maior especificidade de substrato para o óleo de mamona, tornando-se atrativa para aplicação na obtenção de biodiesel a partir deste óleo. Comprovou-se a eficiência do polímero polipropileno poroso, usado como suporte para lipases, através da imobilização da lipase comercial PS AMANO, porém não foi possível imobilizar a lipase em estudo nas condições testadas. A técnica de FT-IR acoplada à quimiometria mostrou-se adequada para diferenciar as amostras de leveduras quanto ao seu perfil de impressão digital metabólico, porém não em relação ao tempo de cultivo.

# SELECTION OF LIPOLYTIC YEASTS ISOLATED FROM BROMELIADS AND PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF THE *Debaryomyces melissophilus* B181 LIPASE

Author: Luiza Lux Lock  
Advisor: Patrícia Valente

## ABSTRACT<sup>2</sup>

Yeasts, due to their versatility, culture facilities, less propensity to contamination and for being safer than other microorganisms to the human health, have been the aim of several researches about enzymes production for industrial applications. The aim of this project is to evaluate the catalytic activity of lipases produced by yeasts isolated from the phylloplane of bromeliads in Parque Itapuã for its application in the biosynthesis of esters. Yeasts were selected by the methods: growth using Tween 80 as the only carbon source; fluorimetry using rhodamin B; and growth in media with CaCl<sub>2</sub>. To the selected yeast as the best lipase producer, the growth curve and the enzyme characterization were performed. After that, the enzyme was submitted to the immobilization technique in commercial polystyrene and polypropylene synthesized during our work. Then, the yeasts samples that had shown a good lipolytic activity and one with a bad activity were selected to the experiment of correlation between the FT-IR spectrum of the microbial biomass cultivated with or without rhodamin B and the lipolytic activity measured by titrimetry. We verified that yeasts isolated from bromeliads from Parque Itapuã, RS, are a good source for microbial lipases. The yeast *Debaryomyces melissophilus* B181 was selected as the best extracellular lipase producer, which is characterized as a neutral and mesophylic lipase with nutritional dependence similar to *Candida* sp. The lipase show low stability to the transesterification solvents methanol and ethanol, but has high substrate specificity to castor oil, becoming attractive to biodiesel production from this oil. We proved the efficiency of the polypropylene synthesized through the immobilization of the commercial lipase PS AMANO, but we could not immobilize the *Debaryomyces melissophilus* B181 lipase in the tested conditions. The FT-IR technique coupled to chemometrics seemed to be appropriate to differentiate yeasts samples by their metabolic fingerprint profile, but not related to the cultivation period.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Leveduras.....	4
2.2 Lipases .....	5
2.3 Lipase de <i>Candida rugosa</i> .....	6
2.4 Lipases produzidas por outras leveduras .....	8
2.4.1 Leveduras patogênicas .....	8
2.4.2 <i>Candida antartica</i> .....	8
2.4.3 <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	9
2.4.4 Leveduras emergentes produtoras de lipase .....	11
2.5 Lipases recombinantes .....	14
2.6 Métodos de otimização da produção e da seletividade enzimática .....	16
2.6.1 Engenharia do meio .....	16
2.6.2 Engenharia do biocatalisador .....	20
2.6.3 Engenharia da proteína .....	20
2.7 Técnicas qualitativas e quantitativas para determinação da atividade lipolítica .....	21
2.8 Espectroscopia de Infravermelho .....	23
2.9 Análise Quimiométrica .....	28
3 METODOLOGIA .....	32
3.1 Materiais .....	32

3.2 Amostragem .....	33
3.3 Seleção de leveduras produtoras de lipases .....	37
3.3.1 Triagem utilizando Tween 20 como única fonte de carbono .....	37
3.3.2 Triagem utilizando rodamina B como substrato fluorimétrico .....	38
3.3.3 Seleção de leveduras produtoras de lipases extracelulares .....	38
3.4 Curva padronizada de células viáveis para <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 .....	39
3.5 Procedimento usado para determinação da atividade lipolítica .....	40
3.6 Procedimento utilizado para determinação de proteínas totais .....	41
3.7 Caracterização da amostra <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 .....	42
3.8 Produção de lipase por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 durante 48h .....	44
3.9 Caracterização da lipase produzida pela cepa selecionada .....	44
3.9.1 Determinação da temperatura ótima para atividade lipolítica da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81.....	45
3.9.2 Determinação do pH ótimo para atividade lipolítica da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 .....	45
3.9.3 Determinação da sensibilidade da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 aos álcoois metílico e etílico .....	46
3.9.4 Determinação da especificidade do substrato .....	47
3.10 Otimização da produção de lipase por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 através de meios de cultura indutores .....	47
3.11 Imobilização da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 em materiais poliméricos .....	48
3.11.1 Imobilização da lipase em caldo contendo poliestireno .....	49

3.11.2 Imobilização de lipases em polipropileno poroso .....	50
3.11.2.1 Preparação do polipropileno poros.....	50
3.11.2.2 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase PS AMANO no polipropileno preparado e determinação de seu ponto de saturação ...	51
3.11.2.3 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 no polipropileno preparado .....	52
3.12 Caracterização espectrofotométrica das amostras .....	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1 Triagem de amostras .....	55
4.2 Curva padrão de células viáveis para <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 .....	58
4.3 Caracterização da amostra selecionada como melhor produtora de lipase .....	59
4.4 Produção de lipase por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 durante 48 h .....	66
4.5 Caracterização da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI 81 .....	67
4.5.1 Determinação da temperatura ótima da atividade lipolítica de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 em pH 7,0 .....	67
4.5.2 Determinação do pH ótimo para atividade lipolítica de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 à 35°C .....	69
4.5.3 Determinação da sensibilidade da enzima produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 aos álcoois metanol e etanol a 35°C e pH 7,0 .....	70

4.5.4 Determinação da especificidade de substrato para a enzima produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 à 35°C e pH 7,0 .....	72
4.6 Otimização da produção de lipase pela levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 através de meios de cultura indutores .....	74
4.7 Imobilização da lipase em materiais poliméricos .....	75
4.7.1 Imobilização da lipase de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 em caldo contendo poliestireno .....	75
4.7.2 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase PS AMANO no polipropileno preparado e determinação de seu ponto de saturação .....	77
4.7.3 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 no polipropileno poroso preparado ....	80
4.8 Caracterização espectrofotométrica das amostras .....	82
5 CONCLUSÕES .....	96
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	98
7 VITA .....	111

## LISTA DE TABELAS

1 – Reagentes utilizados no projeto	32
2 - Tampões utilizados para determinação do pH ótimo .....	46
3 - Meios de cultura indutores de lipase testados .....	48

## LISTA DE FIGURAS

1 – Esquema de um espectrofotômetro de FT-IR .....	24
2 - Equação que determina a unidade de atividade lipolítica .....	40
3 - Triagem em placa utilizando Tween 20 como fonte de carbono .....	56
4 - Triagem em placa utilizando azeite de oliva como fonte de carbono e rodamina como substrato fluorimétrico. ....	57
5 - Curva de Absorbância versus células totais para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> (BI81).....	58
6 - Curva de Biomassa Seca para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	60
7 - Curva de células totais para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 .....	60
8 - Curva de células viáveis para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	61
9 - Curva de proteínas totais para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	62
10 - Curva de pH para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	63
11 - Curva de atividade lipolítica para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	
12 - Curva de atividade lipolítica em intervalos de 12h para a levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	66
13 - Curva de temperatura para a lipase produzida pela levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	68

14 - Curva de pH para a lipase produzida pela levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 .....	70
15 - Curva de sensibilidade aos álcoois metanol e etanol para a lipase produzida pela levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 .....	71
16 - Especificidade de substratos para a lipase produzida pela levedura <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	72
17 - Comparação de meios indutores da atividade lipolítica da lipase isolada de <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	74
18 - Atividade lipolítica da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81 em caldo puro e em caldo contendo poliestireno .....	76
19 - Proteínas totais presentes em caldo puro e em caldo contendo poliestireno, inoculados adicionados da lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81.....	77
20 - Curvas de atividade lipolítica da lipase PS AMANO pura e imobilizada em PP (remanescente) .....	78
21 - Comparação da atividade lipolítica remanescente em caldo contendo a lipase PS AMANO e a lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81, tanto puras quanto imobilizadas .....	81
22 - Comparação das proteínas totais presentes no caldo contendo a lipase PS AMANO e a lipase produzida por <i>Debaryomyces melissophilus</i> BI81, tanto puras quanto imobilizadas .....	82
23 - Dendograma para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação .....	83
24 - Dendograma parcial, correspondente ao grupo 1, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendograma correspondem às amostras agrupadas .....	84

25 - Dendograma parcial, correspondente ao grupo 2, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendograma correspondem às amostras agrupadas .....	85
26 - Dendograma parcial, correspondente ao grupo 3, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendograma correspondem às amostras agrupadas .....	85
27 - Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 24h de incubação .....	86
28 - Curva comparativa para os valores de SEV dos modelos do PLS otimizado e não otimizado pela seleção de faixas espectrais em 24h.....	87
29 - Curvas comparativas para os valores de rVal dos modelos do PLS otimizado e não otimizado pela seleção de faixas espectrais em 24h .....	87
30 - Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 48h de incubação .....	88
31 - Curva comparativa para os valores de SEV dos modelos do PLS otimizado e não otimizado pela seleção de faixas espectrais em 48h.....	89
32 - Curva comparativa para os valores de rVal dos modelos do PLS otimizado e não otimizado pela seleção de faixas espectrais em 48h .....	90
33 - Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 72h de incubação .....	91
34 - Curva de SEV para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas sem rodamina em 72h de incubação .....	91

35 - Curva de rVal para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas sem rodamina em 72 de incubação .....	92
36 - Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para do melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas na presença de rodamina no período de 48h de incubação .....	93
37 - Curva de SEV para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas na presença de rodamina em 48h de incubação .....	94
38 - Curva de rVal para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas na presença de rodamina em 48h de incubação. ....	94

## 1 INTRODUÇÃO

A exploração da biodiversidade como uma fonte de inovação biotecnológica não é um fato novo. A procura de produtos naturais bioativos como uma das principais formas de descoberta de novos fármacos tem movimentado esta bioindústria e aberto o caminho para outros tipos de incursões, particularmente no que diz respeito ao uso de leveduras. Estudos que avaliem o potencial biotecnológico desta classe de microrganismos poderão contribuir efetivamente para a inovação biotecnológica. Uma das áreas onde este potencial pode ser verificado é na produção de enzimas, em particular das lipases. Lipases são enzimas com inúmeras aplicações comerciais, cuja produção, por leveduras, é ainda pouco explorada, apesar de amplamente difundida.

As lipases têm sido largamente utilizadas em hidrólise e transesterificação de triacilgliceróis e em síntese e hidrólise seletivas de vários ésteres, tornando-se enzimas de grande interesse para as indústrias de alimentos, fármacos, oleoquímica e detergentes.

As leveduras, devido a sua versatilidade, facilidade de cultivo, menor propensão à contaminação e por oferecerem menor risco à saúde pública, têm sido alvo de inúmeras pesquisas direcionadas a produção de enzimas para aplicação em processos industriais.

Pelo exposto acima, pode-se perceber a importância que estudos de bioprospecção assumem para a inovação biotecnológica. Além disso, o conhecimento quase inexistente da biodiversidade de leveduras em ecossistemas brasileiros, principalmente fora do eixo Rio – São Paulo – Minas Gerais, ressalta a importância deste projeto.

Baseado no exposto acima, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar a atividade catalítica de lipases produzidas por leveduras isoladas de folhas de bromélias no Parque de Itapuã visando sua aplicação na biossíntese de ésteres. Os objetivos específicos foram:

1 – Selecionar leveduras que apresentem possível atividade lipolítica através de métodos clássicos e métodos de detecção *in situ* utilizando substratos fluorimétricos.

2 – Otimizar métodos de triagem de leveduras produtoras de lipases.

3 – Avaliar a aplicação de ferramentas quimiométricas na classificação e na previsão de atividade lipase de leveduras isoladas de bromélias.

4 – Avaliar aspectos da fisiologia da levedura selecionada como melhor produtora de lipase extracelular.

5 – Determinar as melhores condições para a atividade lipolítica da lipase em estudo.

6 – Avaliar condições para a imobilização por adsorção hidrofóbica da lipase a ser produzida.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Leveduras**

As leveduras são microrganismos predominantemente unicelulares, amplamente distribuídos na natureza e pertencentes ao reino Fungi. São caracteristicamente esféricas ou ovais. Apresentam, assim como os fungos, parede celular, nutrição heterotrófica através de absorção dos nutrientes, reprodução sexuada através de células especializadas denominadas esporos, e ausência de motilidade, entre outras. Diferenciam-se dos demais fungos por possuírem um talo predominantemente unicelular, realizarem a reprodução assexuada por brotamento ou fissão, não serem filamentosas e não formarem corpos de frutificação (Kurtzman e Fell, 1998).

São microrganismos capazes de crescimento aeróbio ou anaeróbio facultativo, podendo utilizar o oxigênio ou um componente orgânico como acceptor final de elétrons, o que os torna capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais. Na ausência de oxigênio as leveduras fermentam os

hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono, sendo úteis em processos industriais principalmente na área de alimentos (Aidoo *et al.*, 2006; Moreno-Arribas e Polo, 2005). As leveduras são encontradas principalmente nos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* e entre os fungos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995).

## **2.2 Lipases**

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases), principalmente as de origem microbiana, têm sido largamente utilizadas em hidrólise e transesterificação de triacilgliceróis e em síntese e hidrólise seletivas de vários ésteres, sendo diferenciadas, basicamente, pela especificidade do substrato e pela cinética das reações (Lin *et al.*, 1996, Quyen *et al.*, 1998, Fernández *et al.*, 2000). São enzimas capazes de degradar ésteres acil-*p*-nitrofenólicos, Tweens (ésteres de sorbitol), e fosfolipídeos, e na hidrólise de triacilgliceróis produzem moléculas de glicerol e de ácidos graxos livres (Henne *et al.*, 2000).

O termo “enzimas lipolíticas” se refere tanto às lipases quanto às esterases, sendo que as primeiras diferem das segundas devido à sua habilidade de atuar em ésteres insolúveis em água. As lipases agem preferencialmente em substratos emulsificados com longas cadeias de ácidos graxos, enquanto as carboxilesterases hidrolisam ésteres solúveis em água ou emulsificados com cadeias relativamente pequenas de ácidos graxos (Sommer *et al.*, 1997; Henne *et al.*, 2000). É por isto que as lipases, ao contrário das esterases, precisam de uma interface água-óleo para atingirem sua atividade ótima. A produção de lipases é vasta entre as leveduras, mas poucas são

capazes de produzir lipases com características interessantes e em quantidade suficiente para que sejam utilizadas industrialmente. Entre as principais aplicações industriais das lipases tem-se a fabricação de alimentos, fármacos, biocidas e biosurfactantes, a modulação de biosensores, a produção de *flavours* (bioaromas) e fragrâncias derivadas de lipídios e no tratamento de resíduos de azeite de oliva (Benjamin & Pandey, 1998; Lanciotti *et al.*, 2005; Wache *et al.*, 2006).

### **2.3 Lipase de *Candida rugosa* (CRL)**

A lipase de *Candida rugosa* (CRL) é uma das enzimas de maior utilização em biotransformações e possui a grande vantagem de ser considerada segura para a aplicação na indústria de alimentos (Benjamin & Pandey, 1998; Akoh *et al.*, 2004; de Maria *et al.*, 2006), sendo por isso amplamente abordada por pesquisadores em trabalhos científicos. A enzima bruta é composta por pelo menos 5 isoenzimas, denominadas de LIP1 a LIP5 (CRL1 a CRL5), as quais compartilham uma alta seqüência de homologia, apesar de apresentarem diferentes características e especificidade de substratos (Ferrer *et al.*, 2001; Xin *et al.*, 2002; de Maria *et al.*, 2006). Chang *et al.* (2005, 2006a) relatam a existência de 7 isoformas com estabilidade térmica e especificidade de substratos distintas, codificadas pela família de genes *lip*. A divergência de seqüência das isoformas está localizada na “tampa”, uma espécie de curva móvel que modula o acesso para o sítio ativo (Brocca *et al.*, 2003). Preparações enzimáticas comerciais são misturas de isoformas, e a falta de reprodutibilidade das reações de biocatálise utilizando a CRL comercial

pode ser devida à presença de várias isoformas no extrato, o que complica a interpretação dos resultados (Ferrer *et al.*, 2001; Akoh *et al.*, 2004). A purificação da CRL bruta aumenta sua especificidade de substrato, enantiosseletividade, estabilidade e atividades específicas (Akoh *et al.*, 2004). As enantiopreferências de CRL são explicadas pela sua estrutura e flexibilidade conformacional (Holmquist 1998; Cygler & Schrag, 1999). A lipase de *C. rugosa* tem tendência para formar agregados bimoleculares em solução, alterando o centro ativo e modificando a funcionalidade da enzima (Palomo *et al.*, 2003).

A regulação da síntese e secreção de CRL é complexa (Ferrer *et al.*, 2001). De Maria *et al.* (2005) estudaram o efeito de vários indutores na produção de novas lipases de *C. rugosa*. Estes autores relataram que LIP2 e LIP3 eram sempre secretadas, enquanto LIP1 era induzida por n-dodecanol em culturas em batelada e por ácido oléico em experimentos com biorreatores de batelada alimentada (*fed-bacth*). Assim, concluiu-se que a natureza do indutor controla o percentual de isoenzimas no extrato enzimático bruto.

O gene LIP1 (CRL1) codifica para a principal isoforma de CRL, e compartilha 40 e 30% de similaridade com as lipases de *Galactomyces candidum* e *Yarrowia lipolytica*, respectivamente (Mileto *et al.*, 1998). Esta isoforma possui várias aplicações, como hidrólises e esterificações estéreo-específicas e não específicas e a produção de um substituto para a gordura do leite humano (Chang *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2006). LIP2 (CRL2) possui uma alta atividade esterase para ésteres *p*-nitrofenílicos com atividade ótima em pH 7 e temperatura entre 30 e 50 °C (Lee *et al.*, 2002). A isoforma LIP3 (CRL3) apresenta alta atividade para ésteres de colesterol (Brocca *et al.*,

2003), e age em triacilgliceróis e ésteres estearílicos derivados de plantas, o que é de considerável interesse no tratamento de resíduos da indústria de papel (Tenkanen *et al.*, 2002). Lopez *et al.* (2004) estudaram a reatividade das isoenzimas puras de *C. rugosa* (LIP1, LIP2 e LIP3) em meio aquoso e orgânico. LIP1 e LIP3 apresentaram estabilidade similar, enquanto LIP2 foi a menos estável. As maiores diferenças foram encontradas na hidrólise de triacilgliceróis. Cadeias pequenas, médias e longas de triacilgliceróis foram determinadas como os substratos preferidos por LIP3, LIP1 e LIP2, respectivamente (Lopez *et al.*, 2004). As outras isoenzimas ainda não foram caracterizadas.

## **2.4 Lipases produzidas por outras leveduras**

### **2.4.1 Leveduras patogênicas**

A produção de enzimas, assim como proteinases aspárticas (Saps) e fosfolipases, por leveduras potencialmente patogênicas é um reconhecido mecanismo de virulência (Schaller *et al.*, 2005). Algumas leveduras patogênicas são capazes de produzir lipases (Neugnot *et al.*, 2002; Brunel *et al.*, 2004; Schaller *et al.*, 2005), mas a relevância clínica específica desta enzima ainda não foi estabelecida.

### **2.4.2 *Candida antarctica***

Depois de *C. rugosa*, a segunda lipase produzida por leveduras mais estudada é a de *Candida antarctica* (CAL), particularmente a lipase B (CALB) (Kose *et al.*, 2002; McCabe & Taylor, 2002; Ottoson *et al.*, 2002; Shimada *et al.*,

2003; Qian & Lutz, 2005;). A lipase B tem várias aplicações, assim como a síntese de ésteres constituintes de *flavors* e fragrâncias (Larios *et al.*, 2004), e a acilação de flavonóides (Passicos *et al.*, 2004). *C. antarctica* é considerada uma levedura extremófila, pois está adaptada a temperaturas baixas, e inúmeros pesquisadores buscam o aperfeiçoamento da estabilidade térmica de sua lipase (Suen *et al.*, 2004; Siddiqui & Cavicchioli, 2005). O maior grupamento capaz de se ligar ao sítio ativo da lipase B é o etil, restringindo o número de álcoois secundários que podem ser usados como substratos por esta enzima (Magnusson *et al.*, 2005). A lipase comercial de *C. antarctica*, denominada *Novozym 435*, corresponde a CAL B imobilizada em resina acrílica (Du *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, pesquisadores têm mostrado interesse na lipase CAL A, já que esta apresenta propriedades únicas, sendo termo-estável (acima de 90 °C), catalisando reações com álcoois terciários e estericamente impedidos, apresentando seletividade para ácidos graxos trans, sendo estável em pHs ácidos e demonstrando seletividade química para grupos amino (síntese de aminoácidos e ésteres amínicos) (Maria *et al.*, 2005).

#### 2.4.3 *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*) também é capaz de produzir várias lipases, e a LIP2, uma lipase extracelular, é a mais estudada. Fickers *et al.* (2003) obtiveram 400 mutantes de *Y. lipolytica* a partir de uma única cepa, e selecionaram o mutante LgX64.81 como o de maior potencial para a produção de lipase. LgX64.81 exibiu produção de lipase não

acoplada a repressão catabólica de glicose, apresentando alta produção em meio contendo glicose e um aumento de 10 vezes no rendimento em presença do indutor azeite de oliva. Triptona e ácido oléico foram as melhores fontes de nitrogênio e carbono para a produção de lipase, respectivamente, e na presença de ácido oléico a lipase encontrou-se ligada a célula durante a fase de crescimento antes de ser liberada para o meio de cultura (Fickers *et al.*, 2004). A expressão da LIP2 de LgX64.81 é regulada por metil oleato, o que incentivou o desenvolvimento de um meio de cultura contendo este substrato substituindo o azeite de oliva para a produção industrial de lipase por esta levedura (Destain *et al.*, 2005; Fickers *et al.*, 2005a). A menor sensibilidade do mutante LgX64.81 à repressão catabólica por glicose é devido ao reduzido nível de hexoquinase 1 (HXK1) e, conseqüentemente, a uma menor absorção de glicose (Fickers *et al.*, 2005b). A amplificação do gene LIP2 neste mutante foi usada para selecionar amostras de *Y. lipolytica* superprodutoras de lipase (Fickers *et al.*, 2005c). Outros genes de lipase (LIPY7 e LIPY8) foram obtidos a partir de uma outra cepa de *Y. lipolytica*, e as enzimas purificadas foram caracterizadas (Song *et al.* 2006). Corzo *et al.* (1999) descreveu uma lipase extracelular produzida por *Yarrowia lipolytica* amostra 681 que apresenta 29,5°C e 4,7 como temperatura e pH ótimos, respectivamente. Esta lipase é induzida por Tween 80 em concentrações entre 0,5 e 2 g/mL, inibida por glicerol e possui alta especificidade para os substratos azeite de oliva e óleo de milho.

#### 2.4.4 Leveduras emergentes produtoras de lipase

Embora a maior parte dos estudos relacionados às lipases produzidas por leveduras tratem das espécies mencionadas acima (*C. rugosa*, *C. antarctica* e *Y. lipolytica*), existem algumas leveduras emergentes produtoras de lipase. *Galactomyces geotrichum* e seu anamorfo *Geotrichum candidum* são fungos semelhantes a leveduras capazes de produzir lipases. Fernandez *et al.* (2006) isolou o gene LIPI de *G. geotrichum* amostra BT107 e parcialmente purificou a enzima. D'Annibale *et al.* (2006) analisou a possibilidade de utilizar resíduos de engenhos de azeite de oliva como substratos para produção de lipase por fungos, incluindo uma amostra de *G. candidum*. Holmquist (1998) encontrou, para a lipase de *G. candidum*, uma preferência específica por grupos de ácidos graxos *cis* (delta-9) insaturados de cadeia longa no substrato.

Outra levedura promissora na produção de lipases é *Candida cylindracea*. Kim & Hou (2006) relataram a produção de lipase pela amostra NRRL Y-17506, a qual produz uma lipase extracelular a partir do ácido oléico, e mediram a atividade lipolítica no meio de cultura, tanto por fermentação contínua quanto por fermentação em batelada. Esta amostra apresentou a maior atividade lipolítica entre os fungos testados em resíduos de azeite de oliva industrializado (D'Annibale *et al.*, 2006). Os mesmos autores relataram que a produção desta lipase foi induzida pela adição de azeite de oliva e afetada pelo tipo de fonte de nitrogênio utilizada. Há relatos de uma tentativa de separação da mistura racêmica da droga proglumida, utilizada no tratamento de dores neuropáticas, utilizando a lipase de *C. cylindracea* (Muralidhar *et al.*, 2002).

Ciafardini *et al.* (2006a), ao estudarem lipases produzidas por leveduras isoladas de azeite de oliva, relataram que a amostra 1639 de *Williopsis californica* produziu uma lipase extracelular indutível pela presença de ácidos graxos livres no azeite de oliva. A atividade lipolítica de amostras de levedura pode reduzir a qualidade do azeite de oliva, e foi demonstrado que a acidez do azeite inoculado com *W. californica* aumentou durante o armazenamento (Ciafardini *et al.*, 2006b). Esta amostra apresentou atividade lipolítica ótima em pH 6,0 (Ciafardini *et al.*, 2006b).

*Candida utilis* é uma levedura largamente utilizada para a produção de proteínas em célula única, e muitos substratos alternativos têm sido testados com este objetivo (Rajoka *et al.*, 2006 & Gelinas & Barrete, 2007). Fujino *et al.* (2006) relataram a purificação e a caracterização de uma fosfolipase desta levedura, a qual possui dois pHs ótimos: em pH 3,0 ela hidrolisa todos os fosfolipídios sem a adição de íons metálicos, enquanto em pH 7,5 os substratos hidrolisados requerem a adição de íons metálicos.

*Arxula adenivorans* é uma levedura emergente como vetor de expressão para a produção de proteínas heterólogas (Gellissen *et al.*, 2005), assim o conhecimento da secreção natural de proteínas por esta levedura é de grande importância. Boer *et al.* (2005) clonou o gene ALIP1, purificou e caracterizou a lipase produzida por esta levedura. A enzima possui uma seqüência de aminoácidos similar a das lipases de *C. albicans* e *C. parapsilosis*, possui uma estrutura dimérica (100KDa), e uma atividade ótima em pH 7,5 e temperatura de 30°C.

Algumas espécies de leveduras são escassamente estudadas para a produção de lipases. *Kluyveromyces marxianus* mostrou-se produtora de uma lipase altamente termoestável em meio aquoso que também é estável em pHs ácidos e tem boa tolerância a solventes orgânicos (Deive *et al.*, 2003). Kakugawa *et al.* (2002) relataram a purificação e a caracterização de uma lipase de *Kurtzmanomyces* sp., amostra I-11. Esta lipase tem sua atividade ótima a 75 °C e pH entre 1,9 e 7,2, preferência por grupos acila de C18, e é estável em vários solventes orgânicos.

Finalmente, há relatos da produção de lipase pela levedura convencional, *Saccharomyces cerevisiae*. Sua atividade lipolítica está restrita a célula total, ou seja, é uma enzima intracelular, porém possui a capacidade reduzir a qualidade de azeite de oliva extra virgem (Ciafardini *et al.*, 2006a,b). A lipase intracelular tg11p (lipase de triacilgliceróis), isolada desta levedura, possui atividade lipase ou esterase dependendo do pH em que se encontra (Jandrositz *et al.*, 2005). Os interesses acerca da produção de lipase por *S. cerevisiae* são restritos devido a sua característica intracelular.

Relatos da produção de lipase por leveduras basidiomicéticas são extremamente escassos na literatura, mas sabe-se que estas leveduras sobrevivem em ambientes ricos em substratos lipídicos, assim como o filoplano de plantas (Hatzinikolaou *et al.*, 1999). Como exemplo, Masaki *et al.* (2005) descreveu uma enzima semelhante à cutinase de uma amostra de *Cryptococcus* sp., a qual possuía a capacidade de hidrolisar plásticos biodegradáveis.

## 2.5 Lipases recombinantes

A utilização de vetores de expressão para a produção de proteínas normalmente visa o aumento de sua secreção. De forma geral, o gene de interesse é isolado da levedura original produtora da enzima e clonado em um vetor de expressão. Este vetor deve ser, preferencialmente, outra levedura, porque estes microrganismos eucarióticos requerem modificações pós transcrição na enzima, as quais não são possíveis em vetores de expressão bacterianos.

Existem algumas leveduras disponíveis como vetores de expressão, porém a mais utilizada para a produção de uma lipase recombinante é a levedura *Pichia pastoris*, devido a sua alta capacidade de secreção de proteínas e a indução deste mecanismo de secreção por metanol (Gellissen *et al.*, 2005). A proteína secretada por *P. pastoris* pode ser purificada a partir do sobrenadante do meio de cultura e então caracterizada.

Além de objetivar o aumento da produção de lipase, a utilização do sistema de expressão de *P. pastoris* possui outro objetivo. Como mencionado anteriormente, a levedura mais utilizada para a produção de lipase, *C. rugosa*, produz uma mistura de isoformas da enzima, o que complica a caracterização e a análise da atividade lipolítica. Uma maneira de obter cada isoforma separadamente é através da expressão de seu gene correspondente em um hospedeiro heterólogo (Mileto *et al.*, 1998). Assim, muitos autores trabalharam para obter uma eficiente produção de lipase e/ou para obter uma isoforma purificada e caracterizada (Lee *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005, 2006a,b). No entanto, a expressão da lipase de *C. rugosa* em *P. pastoris* apresenta um

problema técnico. *C. rugosa* utiliza um código genético alternativo, lendo o códon CTG como serina ao invés de leucina (universalmente usado), o que torna necessária a realização de uma mutação sítio-dirigida para que *P. pastoris* expresse a proteína corretamente (Lee *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2005, 2006b).

Mileto *et al.* (1998) tentou superar este problema utilizando a levedura *Candida maltosa* como vetor de expressão, pois esta levedura utiliza o mesmo códon que *C. rugosa*. No entanto, como *C. maltosa* não é comumente usada como vetor de expressão, este estudo não foi continuado nos últimos anos. Outras leveduras possuem suas lipases expressas em *P. pastoris*, tais como *G. geotrichum* (Fernandez *et al.*, 2006), *Y. lipolytica* (Song *et al.*, 2006), e *C. parapsilosis* (Brunel *et al.*, 2004). Neugnot *et al.* (2002) expressou duas lipases codificadas por sequências codificadoras de proteínas (open reading frames - ORFs) da levedura *C. parapsilosis* em *S. cerevisiae*, mas apenas a lipase LIP2 mostrou-se ativa.

Outro aspecto a ser considerado sobre as lipases recombinantes é a produção de quimeras, que são proteínas formadas pela ligação de porções de diferentes proteínas originais, normalmente após a manipulação dos genes correspondentes. Utilizando esta técnica, Brocca *et al.* (2003) foi capaz de transferir a atividade colesterol esterase da lipase CRL3 de *C. rugosa* para a lipase CRL1, uma isoforma originalmente incapaz de realizar esta atividade. A mesma modificação foi realizada por Secundo *et al.* (2004), porém a quimera obtida era menos ativa e enantiosseletiva que as isoformas originais. Suen *et*

*al.* (2004) criou uma lipase B quimérica de *C. antarctica* com atividade lipolítica e termo-estabilidade otimizadas.

## **2.6 Métodos de otimização da produção e da seletividade enzimática**

Existem basicamente três tipos de abordagens utilizadas para a melhoria da produção de enzimas e de sua seletividade por substratos (Tsai *et al.*, 2006). A primeira abordagem trata da elaboração das condições de cultivo para o aumento da produção de lipase, da imobilização da enzima e da manipulação de solventes para uma maior atividade enzimática (engenharia do meio e das condições de cultura). A segunda objetiva o melhoramento genético da amostra produtora de lipase (engenharia do biocatalisador), enquanto a terceira abordagem trata da manipulação da enzima a fim de alterar suas características (engenharia da proteína).

### *2.6.1 Engenharia do meio*

Lipases apresentam considerável especificidade enzimática em relação à seletividade de substrato, seletividade de grupo funcional, regiosseletividade (dentro da molécula), estereosseletividade (resolução de enantiômeros e diastereômeros) e quimiosseletividade (produtos gerados) (Vallikivi *et al.*, 2003; Vecchia *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2005). Lipases com diferentes especificidades podem ser produzidas alterando-se a composição do meio de cultura (Lanciotti *et al.*, 2005), e a expressão das isoformas da lipase de *C. rugosa* é governada pelas condições de cultivo ou fermentação (Akoh *et*

*al.*, 2004). Finalmente, a enantiosseletividade da lipase pode ser aumentada por alterações no pH ou na temperatura, pela adição ou eliminação de solventes, adição de compostos Triton X-100 e CaCl<sub>2</sub>, ou ainda pela imobilização da enzima em um suporte.

Alguns componentes do meio de cultura podem estimular a produção de lipase enquanto outros agem como repressores. A produção de lipase sofre repressão pelo catabolismo da glicose, a menos que a levedura seja incapaz de utilizar a glicose em seu metabolismo, como é o caso da *Y. lipolytica* LgX64.81 (Fickers *et al.*, 2005b). Os estimulantes mais comuns para a produção de lipase são ácidos graxos de cadeia longa e fontes orgânicas de nitrogênio (Fickers *et al.*, 2004), enquanto os repressores mais comuns são a glicose e o glicerol (Lakshmi *et al.*, 1999; Isso *et al.*, 2001).

A temperatura e o pH ótimos para a produção de lipase são extremamente variáveis, sendo dependentes do gênero, da espécie e até mesmo do indivíduo em estudo. A lipase de *S. cerevisiae* apresenta 30°C e 7,5 como temperatura e pH ótimos, enquanto as condições ótimas para *W. californica* são pH 6,0 e temperatura de 20°C (Ciafardini *et al.*, 2006). A temperatura ótima de incubação para lipases de *Candida (Yarrowia) lipolytica* e *Pichia (Hansenula) anomala* está em torno de 30 °C, enquanto o pH ótimo fica entre 5,0 – 6,5 e 6,5 – 7,5, respectivamente (Ionita *et al.*, 1997). As condições ótimas de pH e temperatura para a lipase de *Cryptococcus* sp. S2 são 5,7 and 25 °C, respectivamente (Kamini *et al.*, 2000). A levedura geneticamente modificada *Y. lipolytica* LgX64.81, tem temperatura e pH ótimos de 37°C e 7, respectivamente (Fickers *et al.*, 2006). O pH possui um papel importante na

hidrólise de ésteres de ibuprofeno pela lipase de *C. rugosa* lipase (CRL) em meio aquoso. Em pH neutro (7,2), o tamanho do sítio ativo aumenta e ocorre a interação com substratos mais volumosos, como ésteres butílicos ou de ibuprofeno. Em pH ácido (5,6), a abertura do sítio ativo diminui, acomodando substratos mais compactos, como ésteres metílicos. Sendo assim, a seletividade de CRL é pH dependente (James *et al.*, 2003).

Tejo *et al.* (2004) investigou o efeito de solventes orgânicos na estrutura e dinâmica de CRL. Embora o solvente usado (tetracloreto de carbono) tenha causado apenas pequenos efeitos estruturais na lipase, verificou-se uma grande modificação da flexibilidade das cadeias a ele expostas. A porção polar das cadeias se mostrou mais flexível em água do que no solvente orgânico, enquanto a porção hidrofóbica apresentou comportamento contrário. Castillo *et al.* (2005) demonstraram que as lipases são mais ativas nos solventes ciclohexano e octano. É possível aumentar a atividade específica e a enantiosseletividade da lipase produzida por *Candida rugosa* tratando-a com 2-propanol (Colton *et al.*, 1995). Utilizando-se solventes orgânicos, enzimas podem realizar catálises em temperaturas muito superiores àquelas que desnaturam enzimas em meio aquoso. Apesar disso, a inativação da enzima é frequentemente relatada para vários casos em que solventes orgânicos são usados como meio reacional (Castillo *et al.*, 2005).

De acordo com Kaieda *et al.* (2001), é possível utilizar lipases de *Candida antarctica* para a biossíntese de ésteres metílicos em sistemas livres de solventes. O aumento da atividade de água ( $a_w$ ) no meio reacional diminui a velocidade da reação, no entanto alguma atividade de água é fundamental para

a ação da enzima. Em meios com  $a_w$  muito baixa, a enzima não é suficientemente hidratada e apresenta atividade catalítica precária, enquanto em condições de alta  $a_w$ , a desnaturação da enzima pode ocorrer. Utilizar uma  $a_w$  intermediária parece proporcionar atividade catalítica e estabilidade ótimas. O controle da  $a_w$  (principalmente para a água formada durante a esterificação) pode ser feito através da adição de pares de sais hidratados a mistura reacional, ou através de um fluxo de gás equilibrado com o par de sais (Kang *et al.*, 2005).

Os sais causam vários efeitos sobre as propriedades das proteínas, incluindo atividade, estabilidade conformacional e solubilidade. Estes efeitos possivelmente surgem devido à ligação de íons a sítios específicos da proteína, mudando seu grau de hidratação. Yu *et al.* (2005), estudando a lipase de *Candida rugosa*, descobriu que a incorporação de sal poderia manter a conformação da enzima, impedir a alteração do pH ótimo e melhorar a termo-estabilidade e a enantioseletividade da enzima liofilizada em comparação a enzima nativa.

A importância da imobilização da lipase é bem difundida nas aplicações industriais das enzimas, pois biocatalisadores imobilizados possuem vantagens únicas no que diz respeito ao melhor controle do processo, estabilidade aumentada, obtenção de produtos separadamente do catalisador, taxas de declínio de atividade previsíveis e melhor desempenho econômico. As enzimas imobilizadas podem ser usadas repetidamente ou continuamente em um processo reacional e podem ser facilmente separadas dos produtos da reação que estão solubilizados e dos substratos que não reagiram, facilitando o

processo e evitando a contaminação do produto final com a própria enzima. Os métodos de imobilização frequentemente usados estão baseados na adsorção física da enzima em um suporte, em sua adesão ou microencapsulação em um suporte sólido ou a sua ligação covalente a uma matriz sólida (Panzavolta *et al.*, 2005 & Won *et al.*, 2005). As matrizes mais utilizadas são polipropileno (Trubiano *et al.*, 2004), polietileno (Kayirhan *et al.*, 1998), Celite 545 (Mahadik *et al.*, 2002), copolímero de acrilato de metila divinil benzeno (Xu *et al.*, 1995) e precursores de alquil silano (Reetz *et al.*, 1996), porém matrizes de quitosana também podem ser usadas (Pereira *et al.*, 2002).

### **2.6.2 Engenharia do biocatalisador**

A segunda maneira mais usada para aumentar a produção de lipase é a manipulação genética da levedura produtora. Vários estudos visam a obtenção de mutantes com maior produção de lipase do que os indivíduos originais, mas a utilização de sistemas heterólogos de expressão, como *P. pastoris*, também pode ser considerada como engenharia do biocatalisador. Uma maneira eficiente de provocar o aumento da produção de lipase é através da amplificação gênica, já que mais cópias do gene *lip* são capazes de determinar um aumento da produção de lipase (Fickers *et al.*, 2005c).

### **2.6.3 Engenharia da proteína**

A atividade lipolítica pode ser alterada através de modificações estruturais na enzima. Schmitt *et al.* (2002) modelou genes *lip1* sintéticos de *C. rugosa*, expressou-os em *P. pastoris*, e realizou uma pesquisa para determinar

sua especificidade de substrato em relação ao comprimento da cadeia do ácido graxo utilizado. Ele introduziu mutações em diferentes aminoácidos da proteína, obtendo mutantes com especificidade por diferentes comprimentos de cadeia no substrato. Magnusson *et al.* (2005) também redesenhou o tamanho da cavidade responsável pela estereoespecificidade da lipase B de *C. antarctica* através da alteração do aminoácido Trp104, o que criou espaço para a interação da enzima com álcoois secundários e aumentou, conseqüentemente, o número de substratos que podem ser utilizados pela lipase. Esta técnica é muito promissora e deve ser incentivada para que se obtenham lipases com diferentes especificidades de substrato.

## **2.7 Técnicas qualitativas e quantitativas para determinação da atividade lipolítica**

Vários são os métodos que podem ser utilizados para dosagem da atividade lipolítica, porém a titrimetria é um dos mais antigos e utilizados dos ensaios quantitativos devido a sua simplicidade, precisão e reprodutibilidade. É uma técnica confiável para caracterização da ação e especificidade das lipases, bem como quanto ao fenômeno de ativação interfacial. A trioleína (ou, como uma alternativa mais barata, o azeite de oliva, que contém 70% de trioleína) é o substrato internacionalmente aceito e utilizado, pois as lipases apresentam altas taxas de hidrólise em triacilgliceróis de cadeia longa, quando comparadas com triacilgliceróis de cadeia curta.

Um método tradicional de determinar a atividade da lipase tem sido via titulação da acidez resultante da liberação dos ácidos graxos utilizando

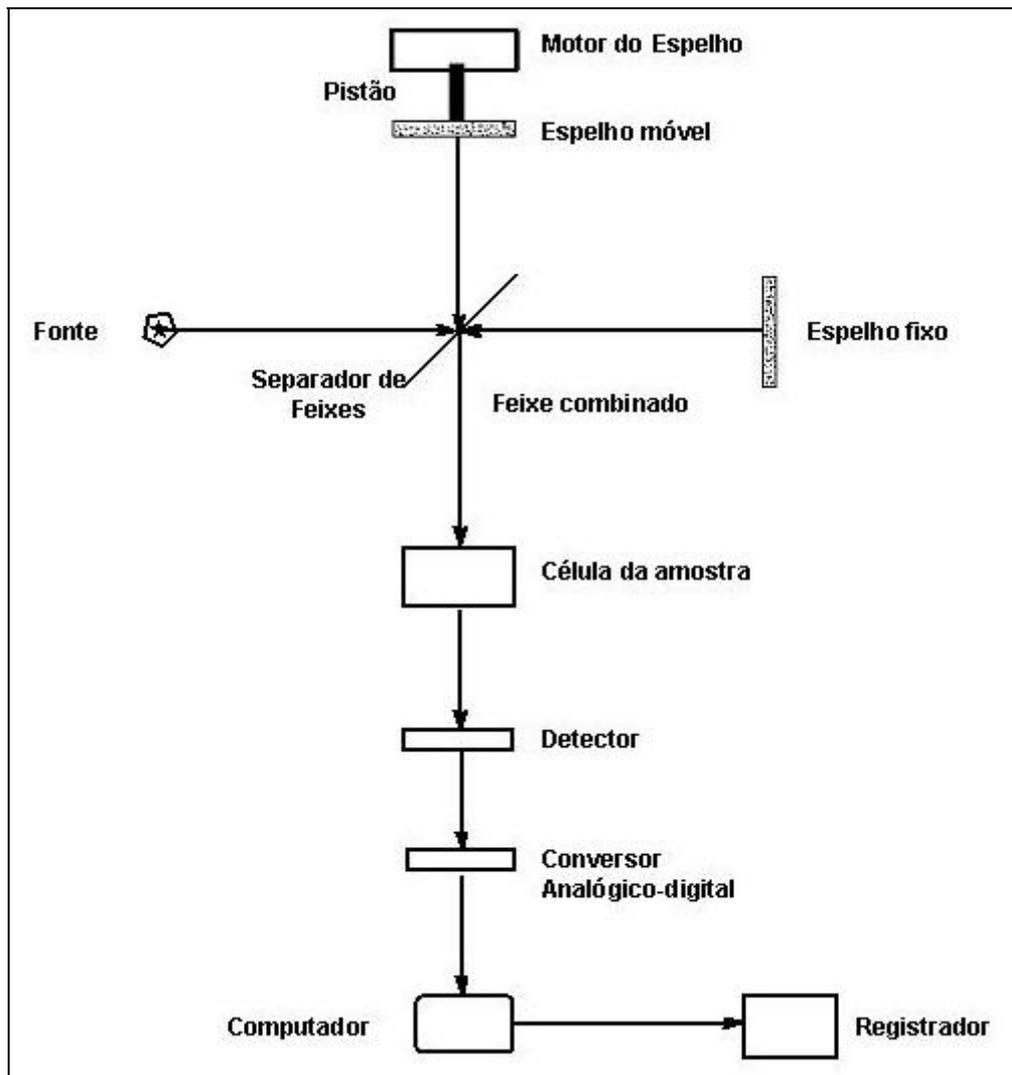
hidróxido de sódio. O método do pH-*start* é muito sensível e, pode detectar a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de ácidos graxos/minuto. Entretanto, para um valor de pH menor que 7 os ácidos graxos livres não estão totalmente ionizados, a titulação pH-*start* é incorreta ou impossível de representar, mesmo após a introdução de um fator de correção. A atividade lipolítica é determinada através de titrimetria simples da mistura até pH 9,0/10,0 após interromper a reação com etanol ou adotando o método da *American Oil Chemistry Society* (AOCS - Ca 5a - 40). A amostra é misturada com propan-2-ol e tolueno e titulada até o ponto final utilizando fenolftaleína (Gupta *et al.*, 2003, Gilham & Lehner, 2005).

Compostos fluorescentes também têm sido utilizados para a determinação de atividade lipolítica, tanto qualitativa quanto quantitativamente. O método envolve a medida da fluorescência dos ácidos graxos liberados pela atividade lipase. Neste método, quantidades da ordem de 20 pico gramas de lipase podem ser detectadas (Jette & Ziomeck, 1994). Técnicas fluorimétricas não sofrem tanta interferência da turbidez para a realização da dosagem, a qual surge em função da lise celular (Gilham & Lehner, 2005). O método de detecção baseado na interação entre o composto fluorimétrico Rodamina B e os ácidos graxos liberados durante a hidrólise enzimática de triacilgliceróis foi descrita por Jette & Ziomek (1994). É um método rápido que permite a utilização de inúmeros substratos, mostra-se insensível a alterações de pH e permite o reisolamento dos microrganismos que não forem inibidos ou tenham suas propriedades fisiológicas alteradas. A hidrólise do substrato provoca a formação de halos fluorescentes rosa-alaranjados em torno ou na própria colônia, sendo visualizados sob luz ultravioleta ( Koueker & Jaeger, 1987).

## 2.8 Espectroscopia no infravermelho

A radiação infravermelha (IR) corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas e a porção de maior interesse para análises de química orgânica está entre 400 e 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein, 1994). Quase todos os compostos que possuem ligações covalentes, sejam eles orgânicos ou inorgânicos, absorvem inúmeras frequências de radiação eletromagnética na região de infravermelho do espectro (Pavia, 1996).

O avanço da espectroscopia no infravermelho como análise quantitativa foi impulsionada pela utilização combinada da Transformada de Fourier e da nova geometria dos espectrofotômetros tornando os equipamentos mais rápidos e robustos (Ferrão, 2001). Esta técnica apresenta diferente princípio de funcionamento e inúmeras vantagens sobre os instrumentos convencionais. A radiação contendo todos os comprimentos de onda é separada em dois feixes, um percorrendo uma distância fixa e outro uma distância variável, pois se direciona a um espelho móvel, como demonstra a Figura 1 (Silverstein, 1994).



**Figura 1.** Esquema de um espectrofotômetro de FT IR.

Nestas condições, quando a diferença entre os comprimentos de onda dos feixes é um número inteiro, ocorre interferência construtiva, e quando a diferença corresponde a um múltiplo ímpar de um quarto do comprimento de onda, a interferência é destrutiva. O resultado de uma variação completa de comprimentos de onda é uma série oscilatória de combinações construtivas e destrutivas, chamada de interferograma. A transformação de Fourier em posições sucessivas do espelho dá origem ao espectro completo de

infravermelho, sendo que a amostra é submetida a uma larga faixa de energias (Silverstein, 1994).

Os anos 90 foram marcados pela introdução de novas potencialidades do infravermelho médio e das técnicas de reflexão: reflexão total atenuada (ATR), detecção fotoacústica e reflexão difusa (DRIFTS) (Ferrão, 2001). A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas, podendo o substrato ser contínuo ou fragmentado. O feixe incidente penetra a superfície da amostra e interage com a matriz, retornando à superfície após absorção parcial e múltiplos espalhamentos. A radiação incidente entra em contato com as partículas da amostra diversas vezes, o que atenua a sua intensidade e fornece informações qualitativas e quantitativas sobre a natureza química da amostra. A radiação que retorna de forma difusa de um substrato é geralmente muito inferior à radiação incidente, o que torna necessária, na maioria das vezes, a utilização de acessórios que visam concentrar a radiação para que esta possa ser focada sobre o sistema de detecção dos instrumentos (Ferrão, 2001).

Do ponto de vista da análise qualitativa, é importante mencionar o efeito que os diferentes tamanhos de partículas podem ter sobre o espectro. Para reduzir este efeito, muitos autores sugerem transformações no espectro, tais como a primeira e a segunda derivadas ou correção do espalhamento multiplicativo (MSC) (Ferrão, 2001).

A DRIFTS está sendo desenvolvida como um novo método de classificação de microrganismos de interesse clínico e industrial, possibilitando a discriminação entre gêneros, espécies e, em alguns casos, amostras com

diferentes tempos de cultivo (Holt, 1995; Choo-Smith, 2001; Kirschner, 2001; Wenning, 2002).

A quantidade de luz absorvida depende das moléculas que compõem a amostra e do ambiente no qual estas se encontram. As frequências de luz observadas no espectro fornecem informações químicas em relação às moléculas presentes nas células e tecidos sem provocar sua destruição (Choo-Smith, 2001; Kirschner, 2001).

O espectro de infravermelho de células microbianas intactas corresponde a uma característica única e específica de cada microrganismo, sendo utilizada para diferenciar, classificar e identificar espécies e amostras de microrganismos. O espectro de infravermelho microbiano é útil para a detecção intramolecular *in situ* de compostos ou estruturas como corpos de inclusão, materiais armazenados e endósporos, para monitorar e quantificar o CO<sub>2</sub> metabolicamente produzido pela utilização de diversos substratos e para caracterizar o fenômeno de crescimento celular e as interações entre células e drogas. As informações características, úteis para a caracterização microbiana, geralmente encontram-se distribuídas sobre todo o espectro de infravermelho, nas regiões de infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR) e infravermelho distante (FIR) (Naumann, 2000).

A Espectroscopia de FT-IR também pode ser aplicada para a identificação de metabólitos sintetizados e excretados por microrganismos, como ácido láctico, ácido acético, etanol, glicose, polihidroxicanoatos e, recentemente, proteínas recombinantes. As análises possibilitam a

quantificação do analito e contribuem para a classificação de cepas desconhecidas (Kansiz, 2000).

Ngo-Thi *et al* (2003) citam a utilização da FT-IR para a caracterização e identificação de microrganismos através do acoplamento de um microscópio ao espectrofotômetro, possibilitando a coleta de espectros diretamente da colônia em cultivo, podendo esta conter uma pequena quantidade de células. Os autores verificaram a possibilidade de classificar amostras do gênero *Staphylococcus* em suas espécies e até mesmo em sub-espécies.

Orsini *et al.* (2000) descreveram o estudo de colônias de *Candida albicans* através da técnica de FT-IR na região espectral entre 850 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Ao analisar a biomassa de diversas regiões das colônias (centro e periferia), obtiveram alterações na região de 850 a 1200  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a zona de absorção dos carboidratos. Também observaram diferença no consumo do componente dextrose do meio de cultura, sendo menor para células envelhecidas (centro da colônia) do que para células jovens que são metabolicamente ativas (periferia da colônia).

Lin *et al.* (2005) também utilizaram FT-IR para a caracterização de amostras de *Alicyclobacillus* em suco de maçã, identificando diferenças na composição de suas membranas celulares e permitindo o agrupamento de amostras semelhantes pela aplicação de ferramentas quimiométricas. Outras aplicações da FT-IR foram descritas para discriminação e classificação de bactérias do gênero *Enterococcus* (Guibet *et al.*, 2003), diferenciação de amostras de *Escherichia coli* (Al-Holy *et al.*, 2006), caracterização de isolados de *Streptomyces* (Zhao *et al.*, 2006), diferenciação de amostras de

*Pseudomonas* spp. (Filip e Hermann, 2001), identificação de espécies de *Lactobacillus acidophilus* (Lughinbühl *et al.*, 2006) entre outras.

## **2.9 Análise quimiométrica**

O objetivo das análises fatoriais é extrair informações essenciais de um grande conjunto de dados misturados e formular uma classificação dos semelhantes. Os objetos ou informações são primeiramente representados como pontos no espaço hiperdimensional, utilizando-se para isso tantas dimensões quanto há de propriedades a serem analisadas. A meta da análise fatorial é calcular, através de um vetor ou valor específico, um novo sistema coordenado de variância, o qual está adaptado às características estruturais do grupo de dados. Os vetores ortogonais do novo sistema coordenado representam informações sobre as características estruturais do complexo grupo de dados. Os objetos podem ser representados no novo sistema coordenado de variância como uma função de propriedades específicas de todo o grupo de dados, sendo melhor do que uma função de absorbâncias ou freqüências. Normalmente, os primeiros 2 a 24 vetores ortogonais do novo sistema coordenado representam, de forma decrescente, a maior parte da variância dos espectros (Naumann, 2000).

Métodos de análises multivariadas estão sendo aplicados com grande sucesso para dados experimentais de vários tipos, principalmente de análises espectroscópicas, a fim de construir modelos de previsão para analitos seletos em amostras biomédicas, iniciando por muitos sinais aleatórios (Escandar *et al.*, 2006). Entre as diversas ferramentas quimiométricas, pode-

se citar as de análise exploratória, como ACP (análise por componentes principais) e AAH (análise por agrupamento hierárquico), e as de calibração multivariada, como PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) e RCP (regressão por componentes principais).

A ACP, um método de “compressão” de dados que se baseia na correlação de variáveis, realizará o agrupamento de variáveis correlacionadas substituindo o conjunto total de variáveis por um novo conjunto denominado de “Componentes Principais”, nos quais os dados serão projetados (Ferreira, 2002; Brereton, 2003; Ferrão, 2003; Lock, 2004).

A AAH realiza a organização dos dados de maneira a enfatizar seus agrupamentos naturais e padrões. Os resultados, de caráter qualitativo, são apresentados na forma de um dendograma, o qual permite a visualização das amostras ou variáveis no espaço bidimensional (Ferreira, 2002; Brereton, 2003; Ferrão, 2003; Lock, 2004).

Modelos de calibração linear são geralmente preferidos devido a sua simplicidade de aplicação e facilidade de interpretação dos dados físico-químicos. Muitos métodos de regressão que são intrinsecamente lineares têm sido propostos para análises multivariadas, entre os quais o mais popular é o PLS. Isto se deve principalmente ao desempenho de seus modelos de calibração, a disponibilidade do *software* e a facilidade de sua implementação. O PLS apresenta várias vantagens importantes: 1- utiliza todos os dados espectrais, uma característica crítica para a determinação de misturas complexas de vários analitos; 2- procedimentos analíticos podem ser realizados em um curto espaço de tempo, geralmente sem nenhuma

purificação da amostra ou separação física; 3- seus modelos de calibração ignoram a concentração de todos os demais componentes que não sejam o analito de interesse na amostra avaliada (Escandar *et al.*, 2006).

O PLS permite a criação de modelo de previsão ou caracterização de dados através da correlação entre a matriz  $\mathbf{X}$ , de variáveis independentes, e um vetor  $\mathbf{Y}$ , o qual representa uma variável dependente. A fim de construir um modelo de PLS com o grupo de dados disponíveis, existem vários aspectos a serem considerados, entre os quais temos as variáveis a serem incluídas no modelo e o número de componentes. A seleção de variáveis deve ser feita de acordo com cada situação, verificando sua importância na modelagem, enquanto o número de componentes principais pode ser obtido através da validação cruzada (Lopes *et al.*, 2002). Neste caso, a validação do modelo ocorre através de um procedimento interno no qual as amostras são excluídas alternadamente (Ferreira, 2002; Brereton, 2003). O PLS calcula estas variáveis a fim de maximizar a co-variância entre os *scores* da matriz  $\mathbf{X}$  e os *scores* do vetor  $\mathbf{Y}$  (Lopes *et al.*, 2002). Um importante aspecto prático da utilização do PLS é que este considera tanto erros na estimativa das concentrações quanto nos espectros obtidos (Brereton *et al.*, 2000).

Um modelo de PLS é considerado eficiente quando é capaz de descrever uma situação real considerando o maior número possível de variações. Quanto maior o número de fatores empregados, menor o desvio da reta de calibração, porém, o aumento de fatores também aumenta o ruído e os erros de modelagem. Um dos critérios mais utilizados para avaliar a eficiência de um modelo é o erro padrão de validação (SEV), o qual determina se o

modelo tende a superdimensionar as variáveis latentes a serem empregadas. Além deste parâmetro, o coeficiente de correlação ( $r_{Val}$ ), que corresponde ao coeficiente entre os valores medidos pelo método de referência e os valores previstos pelo modelos para as amostras, também é frequentemente utilizado para avaliar a eficiência da modelagem (Ferrão *et al.*, 2004).

Vários pesquisadores avaliaram a aplicação de algoritmos quimiométricos em dados obtidos através da espectroscopia de infravermelho, com atenção especial para a região do infravermelho próximo (NIR) (Escandar *et al.*, 2006). Segundo Brereton (2000), a ferramenta PLS pode ser útil quando existe um conhecimento parcial dos dados, como é o caso da determinação de proteínas em trigo através da espectroscopia NIR. Sob estas condições, o modelo é obtido de uma série de amostras de trigo, e o PLS tenta utilizar as características deste conjunto de dados para estabelecer uma correlação com o grupo conhecido de proteínas.

Bittner *et al.* (1995) relataram a obtenção de dados analíticos de vários componentes sanguíneos (proteínas, colesterol e triacilgliceróis) no plasma humano utilizando a calibração multivariada PLS em conjunto com a espectroscopia de NIR.

Tsenkova *et al.* (2001) descreveram a utilização da espectroscopia de NIR para medir a quantidade de células somáticas (SCC) presentes em leite de vaca. A calibração para log (SCC) foi realizada utilizando-se PLS aplicado a diferentes dados espectrais, sendo os dados espectrais obtidos por NIR influenciados principalmente pela alteração de proteínas e concentração de íons no leite.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Materiais

Os reagentes utilizados para o desenvolvimento do projeto encontram-se listados na Tabela 1.

<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>
Ácido cítrico	Vetec
Ágar bacteriológico	Oxoid
Ágar sabouraud	Oxoid
Albumina bovina	Advanced nutrition
Álcool etílico 99 %	Synth
Álcool etílico 95 %	Vetec
Álcool metílico	Synth
Azeite de oliva	Salada
Banha	Sadia
Biotina	Merck
Brometo de potássio	Vetec
Carbonato de sódio	Synth
Citrato de sódio	Nuclear
Cloreto de cálcio	Nuclear
Cloreto de sódio	Nuclear
Cloreto de tiamina	Merck
Cloreto férrico hexahidratado	Synth
Extrato de levedura	Oxoid

Extrato de soja	Mundo integral
Fosfato de potássio dibásico	Nuclear
Fosfato de potássio monobásico	Nuclear
Fosfato de sódio dibásico	Nuclear
Glicina	Vetec
Goma arábica	Synth
Gordura vegetal	Primor
Hexano	Nuclear
Hidróxido de sódio	Vetec
Inositol	Vetec
Lipase PS AMANO	Amano
Óleo de canola	Salada
Óleo de mamona	Pelaware
Óleo de soja	Soya
Peptona bacteriológica	Oxoid
Poliestireno comercial	Estruturas de revestimento de eletrodomésticos
Polipropileno comercial	Garrafa de água mineral Fonte Ijuí
Reagente de Folin	Proton
Rodamina B	Nuclear
Sulfato de amônio	Vetec
Sulfato de cobre pentahidratado	Nuclear
Sulfato de magnésio heptahidratado	Nuclear
Sulfato de magnésio seco	Vetec
Tolueno	Synth
Tween 20	Synth
Tween 80	Synth
Uréia	Planecil
YNB	Sigma

**Tabela 1.** Reagentes utilizados no projeto.

### 3.2 Amostragem

Foram utilizadas amostras de leveduras isoladas de folhas de bromélias do Parque de Itapuã, RS, as quais foram previamente isoladas e caracterizadas por colaboradores (Laboratório de Micologia Ambiental, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UFRGS). As amostras de bromélias foram coletadas durante o período de 05 de abril de 2004 a 19 de

janeiro de 2005, perfazendo um total de cinco coletas no Parque de Itapuã, localizado no município de Viamão, Rio Grande do Sul.

As amostras testadas foram: *Pseudozyma Rubiensis* HB85A, *Fellomyces* sp. BI01, *Cryptococcus* sp.01 BI02, *Bulleromyces albus* BI04, “Yeast-like” 03 BI05, *Metschnikowia fructicola* BI06, *Rhodotorula aurantiaca* BI09, *Cryptococcus* sp.02 BI10, *Cryptococcus albidus* BI14, *Aureobasidium pullulans* BI17, *Sporobolomyces salmonicolor* BI18, *Kockovaella* sp.01 BI20, *Candida* sp. 01 BI21, *Cryptococcus humicolus* BI23, *Rhodotorula sonckii* BI24, *Rhodotorula aurantiaca* BI25, *Sporobolomyces salmonicolor* BI26, “Yeast-like” 07 BI31, “Yeast-like” 10 BI32, *Rhodotorula minuta* BI34, “Yeast-like” 11 BI35, “Yeast-like” 12 BI38, “Yeast-like” 01 BI39, “Yeast-like” 01 BI40, “Yeast-like” 13 BI41, “Yeast-like” 05 BI42, *Rhodotorula aurantiaca* BI43, *Sporobolomyces pararoseus* BI44, *Pseudozyma* sp. BI45, “Yeast-like” 04 BI46, *Aureobasidium pullulans* BI47, “Yeast-like” 09 BI48, “Yeast-like” 01 BI49, *Cryptococcus hungaricus* BI50, “Yeast-like” 01 BI51, *Rhodotorula* sp. BI52, *Itersonilia perplexans* BI53, *Sporobolomyces salmonicolor* BI56, “Yeast-like” 08 BI57, “Yeast-like” 06 BI60, “Yeast-like” 02 BI61, *Rhodotorula* sp. BI63, “Yeast-like” 14 BI64, *Rhodotorula aurantiaca* BI65, BI67, *Kockovaella* sp. 02 BI68, *Debaryomyces vanriijae* BI72, *Rhodotorula* sp. BI77, *Zygossacharomyces Baillo* BI78, *Kockovaella* sp. 03 BI79, *Cryptococcus albidus* BI80, *Debaryomyces melissophilus* BI81, *Sporobolomyces roseus* BI83, *Sporobolomyces roseus* BI84, *Sporobolomyces pararoseus* BI85, *Aureobasidium pullulans* BI87, *Sporobolomyces pararoseus* BI89, *Cryptococcus laurentii* BI91, *Aureobasidium pullulans* BI92, *Aureobasidium pullulans* BI93, *Cryptococcus albidus* BI94, *Debaryomyces*

*hansenii* BI95, *Cryptococcus luteolus* BI96, *Aureobasidium pullulans* BI97, *Sporobolomyces salmonicolor* BI100, *Cryptococcus albidus* BI102, *Aureobasidium pullulans* BI105, *Rhodotorula minuta* BI107, *Sporobolomyces salmonicolor* BI108, *Rhodotorula* sp. BI109, *Cryptococcus flavus*-similar BI111, *Sporobolomyces salmonicolor* BI113, *Rhodotorula minuta* BI114, *Sporobolomyces roseus* BI115, *Rhodotorula aurantiaca* BI116, *Sporobolomyces salmonicolor* BI117, *Cryptococcus albidus* BI118, *Cryptococcus luteolus* BI119, *Rhodotorula* sp. BI120, *Aureobasidium pullulans* BI121, *Candida* sp.02 BI122, *Bullera* sp.01 BI123, *Rhodotorula lignophila*-similar BI124, *Candida glabrata* BI127, *Metschnikowia reukaufii* BI128, *Rhodotorula minuta* BI129, *Bullera* sp.02 BI130, *Sporobolomyces salmonicolor* BI131, *Metschnikowia hawaiiensis* BI132, *Kockovaella* sp. 04 BI133, *Cryptococcus albidus* BI134, *Tremella indecorata* BI135, *Aureobasidium pullulans* BI136, *Rhodotorula bacarum* BI138, *Cryptococcus laurentii* BI139, *Rhodotorula glutinis* BI140, *Rhodotorula lactosa*-similar BI141 *Cryptococcus laurentii* BI142, *Aureobasidium pullulans* BI143, *Cryptococcus laurentii* BI144, *Candida etchellsii*-similar BI145, *Candida diddensiae* BI146, *Sporobolomyces roseus* BI149, "Yeast-like" BI151, *Debaryomyces hansenii* BI153, *Rhodotorula* sp. nov. BI154, *Rhodotorula aurantiaca* BI157, *Sporobolomyces roseus* BI158, *Sporidiobolus pararoseus* BI167, *Prototheca wicherhamii* BI168, *Cryptococcus albidus* BI169, *Prototheca* sp. BI171, *Cryptococcus amylolentus* BI172, *Cryptococcus albidus* BI173, *Prototheca* sp. BI174, *Sporobolomyces roseus* BI179, *Rhodotorula* sp. BI181, *Fellomyces polyborus* BI182, *Bullera* sp.03 BI183, *Cryptococcus* sp.03 BI195, *Cryptococcus* sp. 04 BI196, *Fellomyces*

*fuzhouensis* BI198, *Cryptococcus laurentii* BI200, *Cryptococcus laurentii* BI 202, *Cryptococcus* sp. 05 BI203, *Cryptococcus* sp.06 BI204, *Rhodotorula minuta* BI206, *Cryptococcus laurentii* BI207, *Sporobolomyces roseus* BI208, *Cryptococcus albidus* BI210, *Rhodotorula lactosa* BI211, *Sporobolomyces roseus* BI212, *Cryptococcus albidus* BI215, *Sporobolomyces roseus* BI216, *Rhodotorula aurantiaca* BI217, *Sporobolomyces salmonicolor* BI218, *Sporobolomyces roseus* BI219, *Cryptococcus albidus* BI220, *Sporobolomyces roseus* BI222, *Cryptococcus laurentii* BI223, *Rhodotorula* sp. BI224, *Cryptococcus laurentii* BI225, *Bulleromyces albus* BI226, *Rhodotorula aurantiaca*-Similar BI228, *Rhodotorula* sp. BI229, *Rhodotorula itapuensis* BI230, *Cryptococcus laurentii* BI231, *Rhodotorula* sp. BI232, *Candida* sp.03 BI233, *Sporobolomyces pararoseus*-similar BI234, *Rhodotorula* sp. BI235, *Cryptococcus laurentii* BI236, *Cryptococcus laurentii* BI237, *Rhodotorula* sp. BI238, *Sporobolomyces salmonicolor* BI239, *Sporobolomyces salmonicolor*-similar BI240, *Prototheca wicherhamii* BI241, *Candida* sp. 04 BI242, *Cryptococcus laurentii* BI243, *Bulleromyces albus* BI244, *Sporobolomyces roseus* BI245, *Cryptococcus laurentii* BI246, *Sporobolomyces roseus* BI247, *Trichosporon* sp. BI249, *Tilletiopsis* sp.01 BI250, *Candida* sp.05 BI251, *Sporobolomyces roseus* BI252, *Cryptococcus laurentii* BI253, *Cryptococcus albidus* BI254, *Tilletiopsis* sp.02 BI255, *Sporobolomyces pararoseus*-similar BI256, *Cryptococcus albidus* BI257, *Sporobolomyces roseus* BI258, *Debaryomyces hansenii* BI259, *Tilletiopsis* sp.03 BI261, *Cryptococcus albidus* BI262, *Cryptococcus luteolus* BI264, *Tilletiopsis albescens* BI266, *Sporobolomyces pararoseus* BI267, *Tilletiopsis albescens* BI268,

*Debaryomyces hansenii* EI01, *Trichosporon* sp EI02, *Rhodotorula glutinis* EI03, *Cryptococcus albidus* EI04, *Candida* sp.06 EI05.

### **3.3 Seleção de leveduras produtoras de lipases**

#### **3.3.1 Triagem utilizando Tween 20 como única fonte de carbono**

A atividade lipolítica foi testada em placas de Petri contendo o meio Yeast Nitrogen Base (YNB) acrescido de Tween 20 como fonte de carbono. Como controle positivo foi utilizada a levedura *Yarrowia lipolytica* e como controle negativo *Candida glabrata* (NRRL Y-55). As amostras foram inicialmente inoculadas em tubos contendo água destilada estéril, sendo transferidas para as placas contendo Tween 20 após 24 a 48 horas de incubação a temperatura ambiente. Esta etapa objetivou que as leveduras esgotassem as reservas nutritivas endógenas antes da realização do teste de utilização de Tween 20 como fonte de carbono. Após inoculação no meio YNB com Tween 20, as placas de Petri foram incubadas a 22<sup>0</sup>C por 7 dias. O crescimento utilizando Tween 20 como única fonte de carbono foi considerado evidência de resultado positivo para a produção de lipases (Plou *et al.*, 1998).

Essa primeira etapa de triagem foi realizada para diminuir o número de isolados a serem avaliados através da metodologia de identificação de atividade lipolítica pela utilização de substratos fluorimétricos, a qual foi realizada a seguir.

### **3.3.2 Triagem utilizando rodamina B como substrato fluorimétrico (fluorocromo)**

Esta metodologia está baseada na utilização de óleo vegetal como fonte de carbono e de substratos fluorimétricos para a identificação da atividade lipolítica *in situ* (intracelularmente ou na parede celular). Entre os substratos de maior utilização encontra-se a rodamina B.

Os microrganismos foram inoculados na superfície de placas de petri contendo ágar Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, agar 2%) adicionado de NaCl (4 g/L), azeite de oliva (31,25 mL/L) e solução de rodamina (10 mL/L a 0,001%) previamente esterilizada através da filtração em membrana (poro 45µm). As amostras foram incubadas por 7 dias à 30°C e visualizadas sob luz ultravioleta. Como resultado positivo tem-se as colônias que apresentam coloração rosa-alaranjada fluorescente quando irradiadas com luz ultravioleta. A coloração adquirida se deve a formação de complexos que ocorrem entre os ácidos graxos hidrolisados pela lipase e a rodamina presente no meio de cultura.

### **3.3.3 Seleção de leveduras produtoras de lipases extracelulares**

Verificou-se a produção de lipases extracelulares através do cultivo dos microrganismos em tubos de ensaio contendo ágar lipase inclinado composto por peptona (10 g/L), NaCl (5 g/L), Ágar bacteriológico(20 g/L), Tween 80 (10 g/L) e CaCl<sub>2</sub> (0,5 g/L), durante 7 dias a temperatura ambiente (25°C). A observação de precipitado branco no interior do meio de cultura, o qual corresponde ao cloreto de ácido (sabão de cálcio) formado pela reação

entre o íon cloreto e o ácido graxo hidrolisado pela enzima, indicou resultado positivo para a produção de lipase extracelular, sendo as amostras selecionadas para a próxima etapa.

A comparação da produção de lipase pelas amostras foi realizada através da inoculação de uma quantidade padrão de células (0,1 mL de uma solução com 0,1 de absorbância a 550 nm) suspensas em caldo lipase sobre a superfície do ágar lipase contido em tubos de ensaio não-inclinados (4 mL/tubo). Mediu-se a profundidade que os respectivos precipitados atingiram no interior dos tubos de ensaio após os períodos de incubação de 1, 2, e 3 semanas. Como branco foram utilizados tubos de ensaio contendo 4mL de um meio de cultura semelhante ao ágar lipase, sendo diferenciado apenas pela ausência do Tween 80, aos quais foi adicionada a mesma quantidade de inóculo padronizado.

### **3.4 Curva padrão de células totais para *Debaryomyces melissophilus* BI81**

A levedura foi inoculada em 5 mL de caldo lipase e incubada por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. A partir desta suspensão foram feitas diluições decimais seriadas, transferindo-se 1 mL da suspensão para um tubo com 9 mL de caldo lipase, e assim sucessivamente, até obter um valor de absorbância próximo de zero (a 550 nm).

A contagem de células na suspensão inicial foi realizada usando a câmara de *Neubauer* (número de células/mL). Os resultados de absorbância à 550 nm foram plotados contra o número de células/mL em um gráfico.

### 3.5 Procedimento usado para determinação da atividade lipolítica

O procedimento consistiu na adição de 1 mL de amostra (caldo de cultura) em 19 mL de solução de Tween 80 a 5% em tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup>. O material foi incubado por 24 h a 35°C, em agitador orbital do tipo *shaker* sob agitação constante de 200 rpm. O material incubado foi titulado com NaOH 0,05 mol L<sup>-1</sup> até pH 9,5 com potenciômetro. O controle negativo foi feito por incubação simultânea de 19 mL de solução Tween 80 5% em tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1 mol L<sup>-1</sup> seguido por adição de 1 mL de amostra após a incubação imediatamente antes de iniciar a titrimetria.

A unidade de atividade lipolítica (U) para esta e demais análises especificadas nas seções seguintes, foi considerada como a quantidade, em miligramas, de ácidos graxos liberada pela ação das enzimas contidas em 1mL de inóculo durante o tempo de 1 minuto de incubação (Figura1).

$$U = \frac{(V_{\text{NaOH}}) \cdot (M_{\text{NaOH}}) \cdot 10^6}{T \cdot (V_{\text{inóculo}})}$$

**Figura 2.** Equação que determina a unidade de atividade lipolítica.

Onde:

U = Unidade de atividade lipolítica

$V_{\text{NaOH}}$  = volume de NaOH (mL) consumido durante a titulação, sendo calculado pela diferença entre o volume gasto com a amostra e o volume gasto com o branco.

$M_{\text{NaOH}}$  = concentração (mol/L) do NaOH utilizado

T = tempo de incubação em minutos

$V_{\text{inóculo}}$  = volume de inóculo (mL) utilizado

### **3.6 Procedimento utilizado para determinação de proteínas totais**

Para determinação de proteínas totais utilizou-se o método espectrofotométrico descrito por Lowry et al (1951). Preparou-se uma solução de 2 g/L de albumina bovina em tampão citrato de sódio, a partir da qual obteve-se uma curva de diversas concentrações de albumina. Para tanto, em balões volumétricos de 5 mL, foram adicionadas quantidades previamente calculadas da solução de albumina (entre 0 e 500  $\mu\text{L}$ ) e 3,5 mL de solução C (descrita a seguir), deixando-se a solução em repouso por 15 minutos. Após, foi adicionado 1 mL do reagente de Folin a cada balão, completando com água até 5 mL. Foi medida a absorbância de cada concentração a 660 nm, em triplicata, sendo utilizadas concentrações entre 0 e 200 mg/L.

Para determinação das proteínas totais das amostras, realizou-se a diluição de 1 mL da amostra em balão volumétrico de 10 mL, retirou-se 0,5 mL deste balão e adicionou-se a 3,5 mL da solução C. Deixou-se em repouso por 15 minutos, e então foi adicionado 1 mL do reagente de Folin. Foi medida a absorbância de cada amostra a 660 nm, em triplicata, correlacionando-as com os valores de absorbância da curva para determinação da quantidade de proteínas totais.

Solução C: Em balão volumétrico de 50 mL, adicionar 49 mL da solução A e 1 mL da solução B.

Solução A: Em balão volumétrico de 250 mL, adicionar 1 g de NaOH, 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e completar com água deionizada.

Solução B: Em balão volumétrico de 100 mL, adicionar 1 g de citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>), 0,5 g de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) e completar com água deionizada.

### **3.7 Caracterização da amostra *Debaryomyces melissophilus* BI 81**

Para caracterização da cepa selecionada como melhor produtora de lipase foram analisados os parâmetros células viáveis, células totais (absorbância), pH, produção de biomassa, proteínas totais e atividade lipolítica durante 5 dias de incubação a 25°C sob agitação constante de 200 rpm, havendo uma triplicata de amostras reservada para cada dia de análise.

Foi preparado o pré-inóculo, colocando uma alçada da cultura selecionada em 25 mL de caldo lipase (10 g/L peptona, 10 g/L Tween 80, 5 g/L NaCl e 1000 mL água) dentro de um erlenmeyer, o qual foi incubado por 12 dias em estufa a temperatura ambiente sob cultivo estático. Para determinação das células totais foi medida a absorbância do inóculo a 550 nm. Foi realizada uma diluição seriada (foram feitas três diluições seriadas centesimais, passando 0,1mL de inóculo da diluição superior para 9,9 mL de água estéril da próxima diluição) e foi plaqueada utilizando-se a técnica *pour-plate* (1 mL de inóculo para 15 mL de ágar Sabouraud fundido em placas grandes), em

triplicata. As placas foram incubadas por dois dias a 30°C, após o que foi feita a contagem das colônias (células viáveis).

Foi utilizado 0,5 mL do inóculo padronizado ( $10^0$ ) da amostra selecionada para inocular cada um dos erlenmeyers contendo 25 mL de caldo lipase, os quais foram utilizados na curva de produção de biomassa e atividade lipolítica. Foram inoculados 18 erlenmeyers, 3 para cada dia de coleta/análise. A incubação foi realizada em *shaker* com agitação constante, a 25°C, durante os 5 dias de incubação (tempo 0 até o quinto dia), sendo feitas as análises diariamente em triplicata.

Dos 25 mL de amostra contidos em cada erlenmeyer, 0,2 mL foram recolhidos de forma estéril para a realização da contagem de células viáveis através do método *pour-plate*, como descrito acima. No volume final de cada frasco foi lida a absorbância da amostra a 550 nm e o pH (com potenciômetro). Aliquotas de 20 mL da amostra contida em cada frasco foram centrifugadas (2 min/3500g) para separação da biomassa. A biomassa foi lavada com água e etanol (2 mL), seca em estufa à 40°C até peso constante, e utilizada para determinação de peso seco. O sobrenadante separado pela centrifugação foi utilizado para a realização da dosagem de lipase a 25°C, de acordo com a metodologia descrita no item anterior, e para a dosagem de proteínas totais segundo método de Lowry, também citado anteriormente.

### **3.8 Produção de lipase por *Debaryomyces melissophilus* BI81**

#### **durante 48 horas**

Para melhor verificação do ponto máximo de produção de lipase da amostra selecionada foi realizada a dosagem de atividade lipolítica durante o tempo de incubação de 48h em estufa bacteriológica, coletando-se material de 12 em 12h.

Primeiramente, foi preparado o pré-inóculo, colocando-se 0,5 mL de cultura em 25 mL de caldo lipase dentro de um erlenmeyer de 125 mL. Incubou-se por 2 dias a 30°C em estufa bacteriológica. Para preparação do inóculo foi retirado 0,5 mL do pré-inóculo, o qual foi adicionado a 25mL de caldo lipase dentro de um erlenmeyer de 125 mL. Novamente foi incubado por 2 dias a 30°C em estufa bacteriológica.

Foi inoculado 0,2 mL do inóculo padronizado a 550 nm de absorbância em cada tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo lipase, sendo um total de 15 tubos, três para cada tempo de coleta. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 30°C, sendo retirada uma triplicata a cada 12 horas de incubação, para realização da dosagem de atividade lipolítica. Os tubos foram agitados uma vez por dia, durante 1 minuto, num agitador de tubos vortex (Ciafardini *et al.*, 2006). Após incubação, a atividade lipolítica foi medida como descrito anteriormente.

### **3.9 Caracterização da lipase produzida pela cepa selecionada**

Foi preparado o pré-inóculo colocando 4 mL de cultura da amostra selecionada em 200 mL de caldo lipase dentro de um erlenmeyer. Foi feita a

incubação por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. Para a preparação do inóculo, foram adicionados 4,0 mL do pré-inóculo a um erlenmeyer contendo 200 mL de caldo lipase, o qual foi usado na produção de biomassa para a caracterização da enzima. O erlenmeyer contendo o inóculo foi incubado durante 48h a 30°C em estufa bacteriológica, após o que foi realizada a leitura de absorbância a 550 nm para determinação de células totais.

Para caracterização da enzima, foram determinadas: temperatura ótima, pH ótimo, sensibilidade aos solventes etanol e metanol e especificidade de substratos. Os ensaios de caracterização descritos a seguir foram realizados duas vezes, sendo em cada vez testada uma triplicata de amostras.

### **3.9.1 Determinação da temperatura ótima para atividade lipolítica da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI 81**

Para determinação da melhor temperatura, foram testadas as temperaturas de 25°C, 35°C, 45°C e 55°C, de acordo com o método de dosagem de atividade lipolítica descrito anteriormente.

### **3.9.2 Determinação do pH ótimo para atividade lipolítica da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81**

Para a determinação do pH ótimo, foram utilizadas soluções-tampão de  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$  e Glicina-NaOH com os seguintes valores de pH (Tabela 2):

**Tabela 2:** Tampões utilizados para determinação do pH ótimo.

pH	H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> (0,1M) mL	NaOH (0,1M) mL
6	50	5,7
7	50	29,63
8	50	46,8
pH	Glicina (0,1M) mL	NaOH (0,1M) mL
8,93	9	1
9,71	7	3

A atividade lipolítica da lipase em diferentes pH's foi determinada segundo metodologia descrita anteriormente.

### **3.9.3 Determinação da sensibilidade da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81 aos álcoois metílico e etílico**

Para determinação da atividade enzimática na presença de solventes orgânicos, foram feitas soluções de Tween 80 concentradas em tampão fosfato de potássio monobásico (pH otimizado), as quais continham diferentes concentrações de álcool metílico e etílico (PA).

Foram preparadas quatro soluções diferentes para cada álcool e uma solução “branco” (sem a adição de álcool), utilizando-se 9 balões volumétricos de 200 mL. A cada balão adicionou-se 42,1 mL de uma solução concentrada (20%) de Tween 80 em tampão fosfato de potássio monobásico e uma quantidade específica de etanol ou metanol (0, 5, 10, 20 e 40% de cada álcool na solução final), avolumando-se para 200 mL com tampão fosfato de potássio monobásico sem a adição de Tween 80.

Para determinação da atividade lipolítica, as amostras e os brancos foram testados em triplicata, adicionando-se 19 mL da solução tampão contendo o álcool e 1 mL de inóculo. As soluções foram incubadas em *shaker*

sob agitação constante de 200 rpm, à temperatura otimizada, durante 24h, após o que foi dosada a atividade lipolítica como descrito anteriormente.

#### **3.9.4 Determinação da especificidade do substrato**

Adicionou-se 1 mL do inóculo a 19 mL de tampão fosfato (pH otimizado) contendo 5% do substrato testado e 5% de goma arábica, em triplicata, e incubou-se em *shaker* a 200rpm de agitação, por 24h a temperatura otimizada. Utilizou-se como padrão a solução de Tween 80 á 5% em tampão fosfato de potássio monobásico, sendo analisada também em triplicata. Para cada substrato foram preparados 3 brancos, os quais foram adicionados do inóculo (também mantido na temperatura otimizada) apenas no momento da titulação. Após as 24h de incubação avaliou-se a atividade lipolítica segundo metodologia descrita anteriormente. Os substratos testados foram: azeite de oliva, óleos de canola e mamona, gordura vegetal e banha.

#### **3.10 Otimização da produção de lipase por *Debaryomyces melissophilus* BI81 através de meios de cultura indutores**

A amostra selecionada foi submetida ao crescimento em diferentes meios de cultura líquidos, indutores da produção de lipase, utilizando-se diferentes fontes de carbono e nitrogênio.

Foram colocados 25 mL de cada meio em frascos erlenmeyers, em triplicata, e adicionou-se 0,5 mL de inóculo. As amostras foram incubadas em *shaker*, por 24h a 30°C sob agitação constante de 200 rpm. Após, foi realizada

a dosagem de atividade lipolítica de cada amostra e de seus respectivos brancos, em triplicata, através do método titrimétrico descrito anteriormente.

A composição dos meios testados pode ser observada na Tabela 3, sendo o meio 4 correspondente ao caldo lipase utilizado em grande parte dos ensaios realizados com a enzima selecionada. O ensaio de otimização de meio de cultura foi realizado duas vezes.

**Tabela 3:** Meios de cultura indutores de lipase testados.

Meio	Componentes (g/L)				
	Referência	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio	Sais	Demais componentes (mg/L)
1	Kamini <i>et al.</i> , 2000	Azeite de oliva - <b>10</b>	Extrato de levedura - <b>5</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - <b>10</b> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - <b>1</b>	-
2	Tianwei <i>et al.</i> , 2003	Óleo de soja - <b>5</b>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> - <b>1</b> Extrato de soja - <b>40</b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - <b>1</b> MgSO <sub>4</sub> - <b>0,5</b>	-
3	Lakshmi <i>et al.</i> , 1999	Azeite de oliva - <b>50</b>	Uréia - <b>4</b>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - <b>6</b> MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O - <b>1</b> FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O - <b>0,01</b>	inositol - <b>0.0004</b> biotina - <b>0.008</b> cloreto de tiamina - <b>0.2</b>
4	Gupta <i>et al.</i> , 2003	Tween 80 - <b>10</b>	Peptona Bacteriológica - <b>10</b>	NaCl - <b>5</b>	-

O ensaio de otimização de meio de cultura foi realizado duas vezes.

### 3.11 Imobilização da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81 em materiais poliméricos

Todos os ensaios de imobilização, tanto em poliestireno quanto em polipropileno, utilizando a enzima comercial PS Amano ou a lipase produzida pela amostra selecionada (*Debaryomyces melissophilus* BI81), foram realizados duas vezes.

### 3.11.1 Imobilização da lipase em caldo contendo poliestireno

O pré-inóculo foi preparado colocando 0,5 mL de cultura da amostra selecionada em 25 mL de caldo lipase dentro de um erlenmeyer. O frasco foi incubado por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. Para a preparação do inóculo, foi adicionado 0,5 mL do pré-inóculo a um erlenmeyer contendo 25 mL de caldo lipase, o qual foi incubado em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm, por 48h a 30°C, após o que realizou-se a leitura de absorbância a 550 nm para determinação de células totais.

Foi retirado 0,5 mL do inóculo e adicionado a um erlenmeyer contendo 25 mL de caldo lipase e 75 mg de poliestireno em partículas esféricas, em triplicata. A esterilização do polímero foi realizada separadamente através da irradiação com luz ultravioleta (260nm) durante 30 minutos. Como controle utilizou-se um erlenmeyer contendo a mesma quantidade do inóculo e caldo lipase, sem a adição do poliestireno. Os erlenmeyers contendo o inóculo e o poliestireno, e o caldo puro (controle), foram incubados durante 48h a 30°C em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm.

Realizou-se a dosagem de lipase com o caldo controle, com o caldo contendo as esferas de poliestireno e com as próprias esferas de poliestireno, para verificar se havia ocorrido a imobilização da enzima durante o tempo de incubação. No caso dos inóculos líquidos, foi utilizado 1 mL de inóculo para 19 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,1M, em pH 7,0, em triplicata. Para verificar se ocorria a imobilização da enzima em poliestireno, utilizou-se

como inóculo 47 mg do polímero previamente incubado com o caldo lipase (esferas), para 19 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 0,1M em pH 7,0, em triplicata. A incubação ocorreu em *shaker* sob agitação de 200 rpm, a 35°C, durante o período de 24 horas, após o que foi realizada a titulação de cada amostra e de seus respectivos brancos de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. A determinação de proteínas também foi realizada com o caldo puro, com o caldo contendo o poliestireno e com as esferas de poliestireno, em triplicata, utilizando-se o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para dosar a quantidade de proteína imobilizada nas esferas, o polímero foi lavado, sob agitação constante, com tampão fosfato de potássio pH 7,0 durante 30 min, e então o tampão foi utilizado para a dosagem.

### **3.11.2 Imobilização de lipases em polipropileno poroso**

#### **3.11.2.1 Preparação do polipropileno poroso**

Em um béquer foi colocado 5 g de fragmentos de polipropileno comercial. Em capela, sob agitação constante e aquecimento (agitador magnético), foram adicionados 100 mL de tolueno. Foi realizada a diluição à quente até a obtenção de uma solução viscosa do polímero. Após, a solução foi esfriada a temperatura ambiente até formação de um gel. Neste momento, o gel foi transferido para um becker contendo 200 mL de hexano, também sob agitação, para que ocorresse a precipitação dos flocos de polipropileno. A solução foi centrifugada para precipitação do suporte, lavada com 5 mL de etanol (por tubo de centrifuga) e então centrifugada novamente. Os flocos de polipropileno poroso foram secos em estufa, durante uma semana, a 60°C.

### **3.11.2.2 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase PS AMANO no polipropileno preparado e determinação de seu ponto de saturação**

A avaliação da eficiência da imobilização da lipase comercial PS AMANO no polipropileno poroso produzido foi realizada de acordo com Gitlesen *et al.* (1997).

Foram preparadas concentrações da lipase PS AMANO em tampão fosfato de potássio pH 7,0 em concentrações de 1 a 8 mg/mL. Realizou-se a determinação da atividade lipolítica de cada concentração (branco e amostra) de acordo com a metodologia anteriormente mencionada.

A seguir, foi realizada a dosagem da atividade lipolítica das amostras quando incubadas na presença de polipropileno poroso, a fim de determinar a quantidade de lipase remanescente no caldo, e, indiretamente, a quantidade de lipase adsorvida no polímero. Para cada concentração de lipase PS AMANO, em triplicata, foram retiradas alíquotas de 5 mL, as quais foram adicionados 50 mg de polipropileno poroso e 150 µg de etanol 95%. Estas amostras foram incubadas em *shaker*, sob agitação constante de 200 rpm, a 35°C durante 24h. Após, cada amostra foi filtrada em pipeta *pasteur* com algodão, para a eliminação do polipropileno, e então utilizada para a dosagem da atividade lipolítica como descrito anteriormente.

Através da relação entre a atividade lipolítica da lipase PS pura e imobilizada em polipropileno poroso, foi possível determinar seu ponto de saturação. Para a concentração da enzima determinada como ponto de

saturação, foi realizada novamente a dosagem de atividade lipolítica e de proteínas totais segundo Método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), tanto para a enzima pura quanto para a enzima imobilizada, em triplicata.

### **3.11.2.3 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81 no polipropileno poroso**

O pré-inóculo foi preparado colocando-se 0,5 mL de cultura da amostra selecionada em 25 mL de caldo lipase dentro de um erlenmeyer de 125 mL. Incubou-se por 48h a 30°C em estufa bacteriológica. Para a preparação do inóculo, foi adicionado 1 mL do pré-inóculo a erlenmeyers contendo 50 mL de caldo lipase (em triplicata), os quais foram incubados em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm, a 30°C, durante 48h.

Para determinar a quantidade de células totais presentes em cada erlenmeyer após incubação, foi realizada a determinação de sua absorbância em 550 nm, correlacionando-se com a curva previamente elaborada. A seguir, coletou-se 5 mL do caldo fermentado de cada erlenmeyer, transferiu-se para um becker, e foram adicionados 50 mg de polipropileno poroso e 150 µL de etanol 95%. Os 3 beckers foram agitados em *shaker* sob agitação constante de 200 rpm, durante 24h a 35 °C, após o que foi realizada a filtração dos caldos em pipeta *pasteur* contendo algodão para a separação do polímero, reservando-se o caldo para a determinação da atividade lipolítica residual (atividade das enzimas que não foram adsorvidas pelo polipropileno).

Após extração, a atividade lipolítica do filtrado foi determinada conforme citado anteriormente, enquanto as proteínas totais foram medidas de

acordo com o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para determinar se houve adsorção da enzima, utilizou-se como parâmetro o inóculo não imobilizado, comparando-se a atividade lipolítica.

### **3.12 Caracterização espectrofotométrica das amostras**

As leveduras selecionadas para este ensaio foram aquelas que apresentaram produção de lipase extracelular no ensaio de precipitação do  $\text{CaCl}_2$  em ágar lipase (7 amostras) utilizando-se uma amostra que apresentou resultado negativo como controle. Foi preparado um inóculo de cada amostra de levedura a ser analisada, adicionando-se uma alçada de inóculo em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo lipase. As 8 amostras foram incubadas a temperatura ambiente durante 5 dias. Em seguida foi feita a determinação de células totais conforme metodologia especificada no item 3.3.

Para cada amostra, foram preparados três tubos de ensaio contendo 9mL de caldo lipase, aos quais foi adicionado 1mL da amostra de levedura padronizada. Dos 3 tubos inoculados para cada amostra, um foi analisado após 24h de incubação, o outro após 48h e o último após 72h de incubação. As amostras foram centrifugadas durante 15 min, separando-se a biomassa do sobrenadante. A biomassa foi seca em estufa a 30 °C, durante uma semana, e então analisada por espectrofotometria no infravermelho (FT-IR). O sobrenadante foi utilizado para dosar a atividade lipolítica de cada amostra nos diferentes tempos de incubação conforme metodologia citada anteriormente. Foi realizada a correlação entre a atividade lipolítica das amostras e os

espectros de infravermelho nos três tempos de incubação através de ferramentas quimiométricas do programa *Pirouette*® versão 2.7.

Paralelamente, foi feito o espectro no infravermelho das oito amostras de leveduras cultivadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud adicionado de NaCl (4 g/L), azeite de oliva (31,25 mL/L) e solução de Rodamina (10 mL/L a 0,001%) previamente esterilizada através da filtração em membrana. Após 5 dias de incubação a temperatura ambiente, foi recolhida a porção superficial das colônias de cada amostra, secou-se em estufa durante 7 dias a 50 °C e realizou-se a análise espectrofotométrica. Foi feita a correlação dos espectros obtidos com a atividade lipolítica medida anteriormente em caldo para cada levedura, nos três diferentes tempos de incubação, através das ferramentas quimiométricas AAH e PLS do programa *Pirouette*® versão 2.7.

Os espectros no infravermelho foram coletados em um espectrofotômetro de marca Nicolet e modelo Magna IR550 com faixa espectral de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  e processados com software OMNIC E.S.P. versão 4.1. As amostras foram analisadas por reflexão difusa (DRIFTS) após dispersão em brometo de potássio. Os comprimentos de onda das bandas de absorção foram expressos em  $\text{cm}^{-1}$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Triagem de amostras

Entre as diversas amostras de leveduras isoladas do Parque de Itapuã, 56 apresentaram resultado positivo no teste de crescimento utilizando Tween 20 como única fonte de carbono, como demonstra a Figura 3. As amostras testadas foram: *Pseudozyma rubiensis* HB85A, *Metschnikowia fructicola* BI06, *Rhodotorula sonckii* BI24, *Sporobolomyces pararoseus* BI44, *Sporobolomyces salmonicolor* BI56, BI67, *Kockovaella* sp. BI79, *Debaryomyces melissophilus* BI81, *Sporobolomyces roseus* BI83, *Sporobolomyces roseus* BI84, *Sporobolomyces pararoseus* BI85, *Sporobolomyces pararoseus* BI89, *Sporobolomyces salmonicolor* BI117, *Candida* sp. BI122, *Rhodotorula lignophila*-similar BI124, *Metschnikowia reukaufii* BI128, *Rhodotorula minuta* BI129, *Sporidiobolus pararoseus* BI44, *Candida etchellsii*-similar BI145, “Yeast-like” BI151, *Debaryomyces hansenii* BI153, *Rhodotorula* sp. nov. BI154, *Rhodotorula aurantiaca* BI157, *Sporidiobolus pararoseus* BI167, *Prototheca*

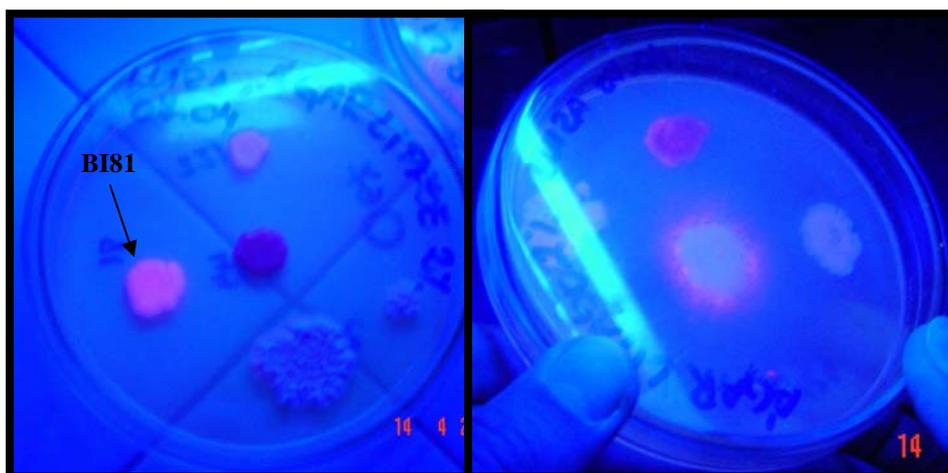
*wicherhamii* BI168, *Prototheca* sp. BI171, *Cryptococcus amylolentus* BI172, *Prototheca* sp. BI174, *Cryptococcus* sp. BI195, *Fellomyces fuzhouensis* BI198, *Cryptococcus laurentii* BI200, *Cryptococcus laurentii* BI 202, *Cryptococcus* sp. BI204, *Rhodotorula minuta* BI206, *Cryptococcus laurentii* BI207, *Sporobolomyces roseus* BI208, *Cryptococcus albidus* BI210, *Sporobolomyces roseus* BI222, *Cryptococcus laurentii* BI225, *Rhodotorula* sp. BI229, *Rhodotorula itapuensis* BI230, *Cryptococcus laurentii* BI231, *Sporobolomyces pararoseus*-similar BI234, *Rhodotorula* sp. BI235, *Cryptococcus laurentii* BI236, *Rhodotorula* sp. BI238, *Sporobolomyces salmonicolor*-similar BI240, *Prototheca wicherhamii* BI241, *Trichosporon* sp. BI249, *Tilletiopsis* sp. BI255, *Tilletiopsis* sp. BI261, *Sporobolomyces pararoseus* BI267, *Debaryomyces hansenii* EI01, *Trichosporon* sp EI02, *Rhodotorula glutinis* EI03, *Cryptococcus albidus* EI04.



**Figura 3.** Triagem em placa utilizando Tween 20 como fonte de carbono.

Entre estas, 26 amostras apresentaram resultado positivo no teste de crescimento utilizando azeite de oliva como fonte de carbono e rodamina como substrato fluorimétrico, observando-se uma fluorescência rosa-alaranjada

nas colônias e ao seu redor. A amostra que mais se destacou nesta etapa da triagem foi *Debaryomyces melissophilus* (BI81), apresentando um halo fluorescente maior e mais acentuado que as demais amostras (Figura 4).



**Figura 4.** Triagem em placa utilizando azeite de oliva como fonte de carbono e rodamina como substrato fluorimétrico.

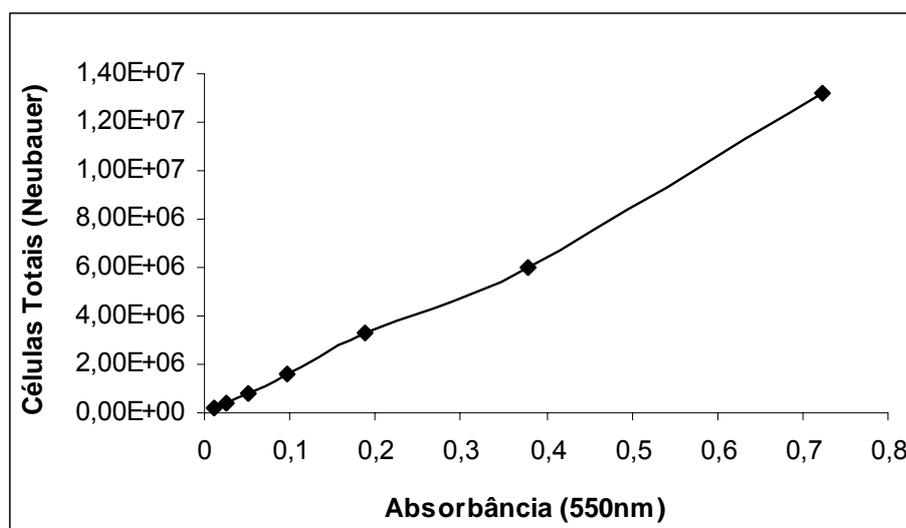
As leveduras que apresentaram crescimento quando cultivadas a temperatura ambiente (18 – 20°C) durante 7 dias de incubação, foram selecionadas para teste de produção de lipase extracelular, as quais foram: *Debaryomyces melissophilus* (BI81), *Sporobolomyces roseus* (BI84), *Rhodotorula sp.* (BI154), *Fellomyces fuzhouensis* (BI198), *Cryptococcus sp.* (BI204), *Cryptococcus laurentii* (BI231), *Sporidiobolus pararoseus* (BI234), *Rhodotorula itapuensis* (BI238), *Sporobolomyces salmonicolor*-similar (BI240), *Debaryomyces hansenii* (EI01) e *Cryptococcus albidus* (EI04).

Observou-se a formação de precipitado composto de sais de ácidos graxos para as amostras *Debaryomyces melissophilus* (BI81), *Sporobolomyces roseus* (BI84), *Cryptococcus laurentii* (BI231), *Sporidiobolus pararoseus* (BI234), *Rhodotorula itapuensis* (BI238), *Sporobolomyces salmonicolor*-similar

(BI240) e *Debaryomyces hansenii* (EI01) quando cultivadas em tubo de ensaio contendo ágar lipase inclinado adicionado de  $\text{CaCl}_2$  durante as duas primeiras semanas de incubação, indicando a produção de enzima extracelular. As amostras *Rhodotorula sp.* (BI154) e *Cryptococcus albidus* (EI04) apresentaram formação de precipitado apenas no final da terceira semana de incubação, enquanto a amostra *Cryptococcus sp.* (BI204) não apresentou formação de precipitado. Desta forma, a amostra *Debaryomyces melissophilus* (BI81) foi selecionada para quantificação da atividade lipolítica, pois foi considerada a melhor produtora de lipase extracelular e apresentou crescimento satisfatório no período de 7 dias de incubação.

#### 4.2 Curva padrão de células totais para *Debaryomyces melissophilus* BI81

A Figura 5 apresenta a curva de absorvância em 550 nm versus células totais, as quais foram visualizadas pela câmara de Neubauer.



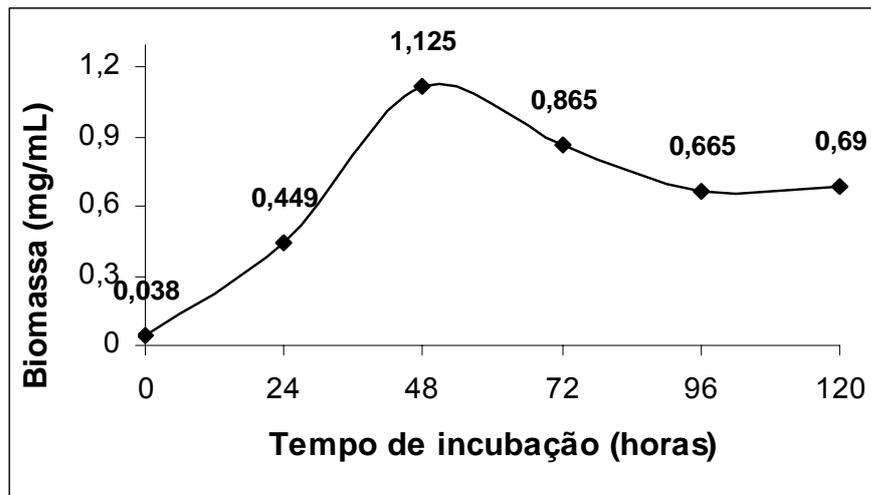
**Figura 5:** Curva de Absorvância versus células totais para a levedura *Debaryomyces melissophilus* (BI81).

Verifica-se a linearidade da curva em todos os pontos medidos, indicando que suspensões de células da amostra *Debaryomyces melissophilus* BI81 que apresentem um valor de absorvância entre 0 e 0,8 em 550nm, podem ser utilizadas como inóculo, pois se encontram devidamente correlacionadas com a quantidade de células totais presentes.

#### **4.3 Caracterização da amostra selecionada como melhor produtora de lipase**

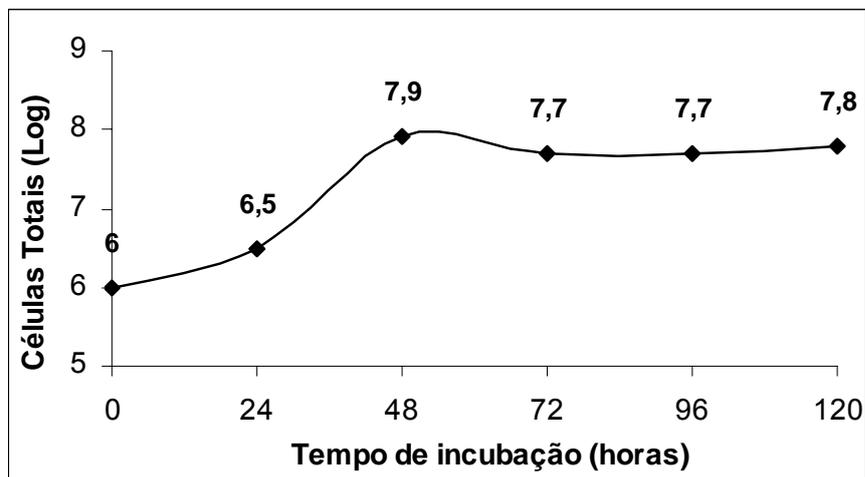
A padronização do inóculo, realizada por espectrofotometria na região do visível em 550 nm, resultou em uma concentração de  $2,23 \times 10^7$  células/mL.

Em relação a biomassa seca produzida, verificou-se um aumento até 48h de incubação, atingindo o máximo de 1,125 mg/mL, sendo que após este pico a biomassa apresentou, de forma geral, um decréscimo até às 120h de incubação (Figura 6). Segundo Lakshmi *et al.* (1999), a biomassa de *Candida rugosa* aumenta até aproximadamente 36h de incubação atingindo 4 mg/mL, e depois se mantém constante até 96h. O tempo que ambos os microrganismos levam para atingir o máximo de biomassa produzido é semelhante, embora *Candida rugosa* atinja um valor de biomassa quase quatro vezes maior do que o apresentado pela amostra *Debaryomyces melissophilus* BI81.



**Figura 6:** Curva de biomassa seca para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

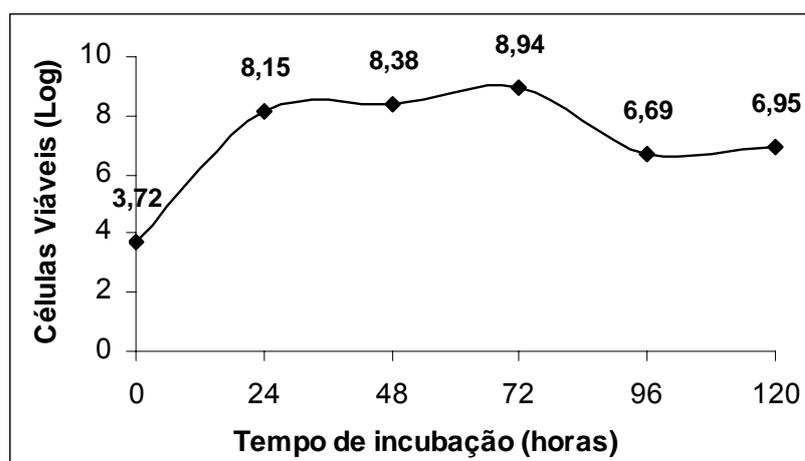
A curva de células totais, obtida pela medida da absorbância do caldo contendo a amostra em 550 nm, também demonstrou maior produção de células no tempo de 48h de incubação, como apresenta a Figura 7.



**Figura 7:** Curva de células totais para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Em relação à quantidade de células viáveis, é possível perceber que o número de células, representado pelo  $\log_{10}$ , aumenta até as 72h de incubação, após o que se verifica um decréscimo até atingir o tempo final de

120h de incubação. A fase log de crescimento corresponde ao período até 24h de incubação, enquanto a fase estacionária corresponde ao período que vai de 24h a 72h de incubação, pois há uma certa constância na quantidade de células viáveis neste período, como apresenta a Figura 8. Segundo Ionita *et al.*, o número de células viáveis para *Candida lipolítica* atingiu o  $\log_{10}$  de 7,91 após 48h de incubação a 30°C, sendo um valor semelhante ao apresentado pela amostra 81 no tempo de 48h de incubação ( $\log_{10} = 8,38$ ). Percebe-se que a quantidade de células totais representada pela massa seca decai mais rapidamente (a partir de 48h) do que a quantidade de células viáveis (a partir de 72h).



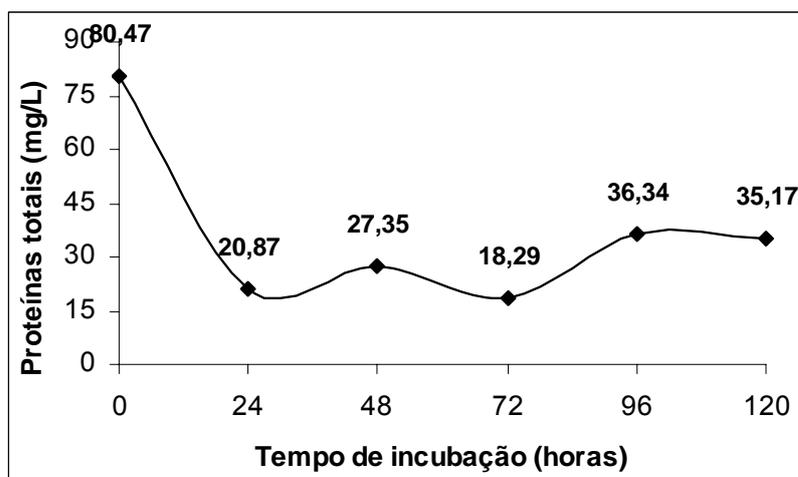
**Figura 8:** Curva de células viáveis para a levedura *Debaryomyces melissophilus* B181.

Em relação às proteínas totais, percebe-se que o valor inicial de proteínas (80,47 mg/mL), antes da incubação da amostra, é maior do que em todo o período de incubação, verificando-se um decréscimo até o tempo de 24h de incubação, o qual corresponde a tempo inicial da atividade lipolítica da amostra. Após 24h, a quantidade de proteínas do meio apresenta relativo aumento, o que sugere a produção de proteínas pela levedura para que seja

possível o consumo do Tween 80 como única fonte de carbono, o que se dá através da atividade das lipases produzidas (Figura 9).

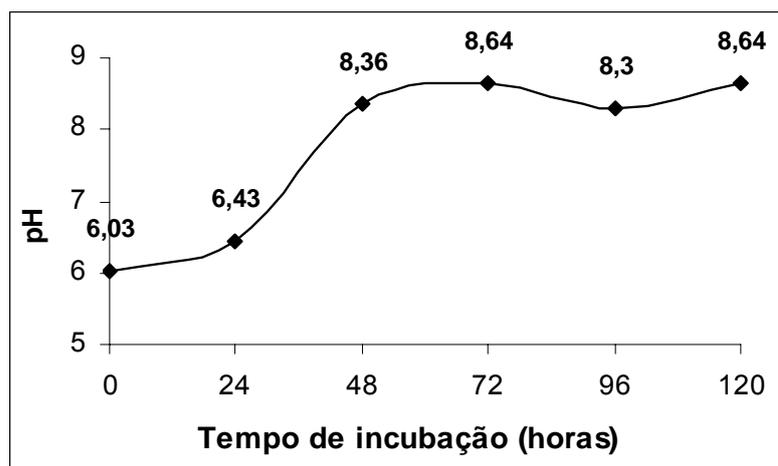
Para identificar se as proteínas medidas correspondem às de atividade lipase poderia ser utilizada a técnica de zimografia, que consiste na submissão das mesmas a um gel de eletroforese utilizando um composto indutor de atividade lipolítica como substrato (palmitato de *p*-nitrofenila, p.ex.), gerando uma banda corada de amarelo que permita visualizar a hidrólise realizada pela lipase.

Segundo Dong *et al.* (1999), as proteínas totais para *Pseudomonas* sp. atingiram 2000,3 mg/mL após 72h de incubação, valor mais de 100 vezes maior do que o encontrado para a amostra *Debaryomyces melissophilus* BI81 após 72h de incubação (18,29 mg/mL). Da mesma forma, segundo Fhu Lin *et al.* (1996), para *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, as proteínas totais após 20-22h de incubação foram de 910 mg/mL, aproximadamente 40 vezes maior do que o valor encontrado para a amostra *Debaryomyces melissophilus* após 24h de incubação (20,87 mg/mL).



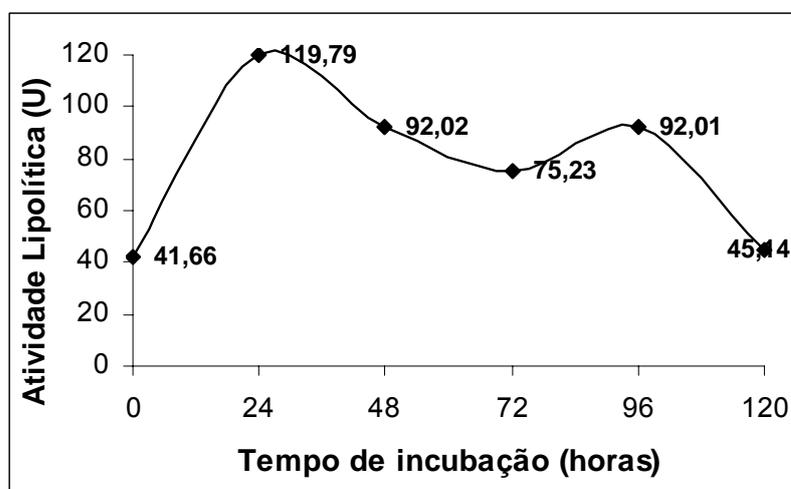
**Figura 9:** Curva de proteínas totais para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

A medida do pH do meio no decorrer da curva de crescimento indica aumento da alcalinidade do meio a partir das 24h de incubação, havendo um aumento realmente considerável a partir de 48h, onde o pH atinge valor de 8,3, se mantendo relativamente constante até o final do período de incubação (Figura 10). Este aumento na alcalinidade pode ser devido ao consumo da peptona que compunha o meio de cultura originalmente, a qual libera amônia ao ser degradada pelas leveduras. É possível perceber que os ácidos liberados durante a hidrólise dos ésteres do Tween 80 não são capazes de acidificar o meio, já que o efeito provocado pela liberação de amônia é mais intenso (a assimilação de Tween 80 é menos intensa que a de peptona). A amônia liberada é uma base fraca, assim como os ácidos resultantes da hidrólise do Tween 80 são ácidos fracos, sendo que o fator determinante no aumento da alcalinidade do meio é o excesso de amônia liberado, indicando maior consumo de peptona em relação ao Tween 80.



**Figura 10:** Curva de pH para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Em relação à atividade lipolítica, é possível perceber que o valor mais alto obtido se encontra em 24h de incubação (119,79 U), havendo um decréscimo, de forma geral, até o tempo final de incubação (120h) (Figura 11). O ligeiro aumento na atividade lipolítica verificado no tempo de 96h de incubação pode ser devido à presença de mais de uma lipase no meio de cultura, a qual poderia atuar tardiamente. Chang *et al.* (2005, 2006a) e Brocca *et al.* (2003) relataram que a lipase de *Candida rugosa* (CRL) é produzida em diversas isoformas, as quais apresentam características próprias de estabilidade e atividade, porém não há relatos sobre a fase de crescimento em que cada isoforma é produzida.



**Figura 11:** Curva de atividade lipolítica para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Segundo Lakshmi *et al.* (1999), para *Candida rugosa*, a atividade lipolítica também aumenta até aproximadamente 36h de incubação (atingindo 4,5 U), e depois se mantém constante até 96h. Segundo Fickers *et al.* (2006),

para *Yarrowia lipolytica*, a atividade lipolítica aumentou até aproximadamente 53h de incubação, atingindo o valor de 1118 U.

É possível perceber que a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81 é semelhante a *Candida rugosa* em relação ao período de incubação correspondente à maior produção de lipase, embora a quantidade de enzima produzida por *Candida rugosa* seja consideravelmente inferior a produzida pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81. Percebe-se também que a faixa de incubação correspondente à alta produção de lipase é maior para *Yarrowia lipolytica*, a qual também produz quantidade muito superior de enzima que a mostra *Debaryomyces melissophilus* BI81, sendo considerada melhor produtora.

Há relatos de amostras com ainda maior atividade lipolítica. Para *Pseudomonas sp.*, a atividade lipolítica após 72h de incubação é de 8001 U (Dong *et al.*, 1999), e para *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, a atividade lipolítica após 20-22h de incubação foi de 37000U (Fhu Lin *et al.*, 1996).

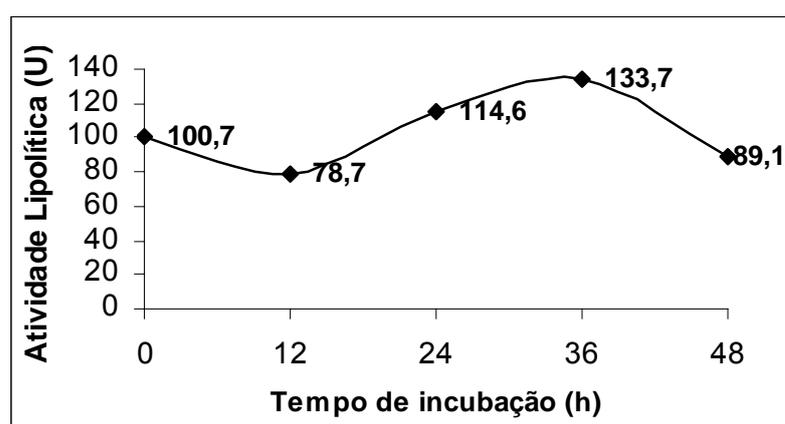
Ao analisar os gráficos em conjunto, é possível perceber que a maior produção de lipase não corresponde ao tempo de maior produção de biomassa e células totais, que se dá em 48h de incubação, pois a atividade lipolítica atinge seu maior valor em 24h de incubação, período que corresponde ao final da fase log de crescimento. Também é possível perceber que as leveduras consomem maior parte das proteínas do meio durante a fase log de crescimento, sendo que durante a fase estacionária há necessidade de produção de proteínas para que seja possível o consumo do Tween 80 como

fonte de carbono através da atividade lipolítica das lipases liberadas pela levedura.

#### 4.4 Produção de lipase por *Debaryomyces melissophilus* BI81 durante 48 horas

A padronização do inóculo, realizada por espectrofotometria na região do visível em 550 nm, resultou em uma concentração de  $2,8 \times 10^6$  células/mL.

Através dos resultados obtidos (Figura 12), é possível verificar que o tempo de melhor atividade lipolítica para a amostra *Debaryomyces melissophilus* BI81 corresponde ao tempo de 24-36h de incubação, o qual também corresponde ao final da fase log de crescimento. Assim, as análises realizadas posteriormente tiveram o período de incubação do pré-inóculo e do inóculo reduzido para 48h, otimizando a produção de enzima e biomassa.



**Figura 12:** Curva de atividade lipolítica em intervalos de 12h para a levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

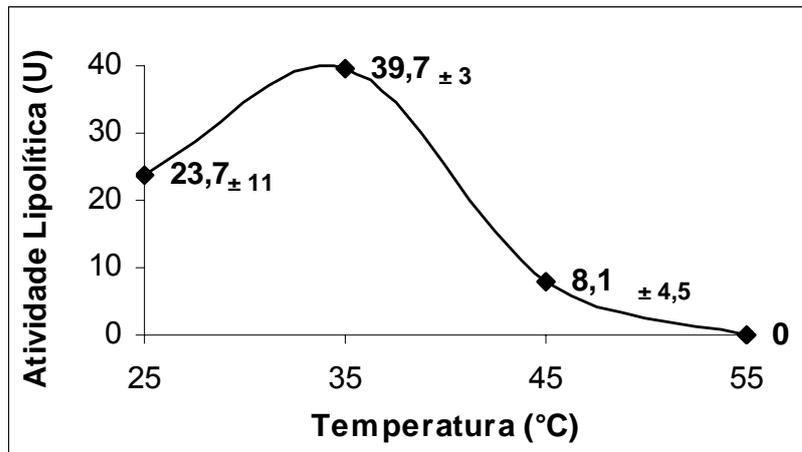
Como visto anteriormente, este resultado se assemelha ao encontrado por Lakshmi *et al.* (1999), para *Candida rugosa*, onde a atividade lipolítica aumenta até aproximadamente 36h de incubação.

#### **4.5 Caracterização da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI 81**

A padronização do inóculo, realizada por espectrofotometria na região do visível em 550 nm, resultou em uma concentração de células média de  $9,1 \times 10^6$  células/mL.

##### **4.5.1 Determinação da temperatura ótima da atividade lipolítica de *Debaryomyces melissophilus* BI81 em pH 7,0**

Verificou-se que 35°C corresponde a melhor temperatura para a atividade lipolítica da cepa *Debaryomyces melissophilus* BI81, como demonstra a Figura 13 (média do ensaio realizado duas vezes). A 25 e 45°C verifica-se uma atividade enzimática mais baixa, enquanto a 55°C a atividade lipolítica se mostrou nula.



**Figura 13:** Curva de temperatura para a lipase produzida pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Estes resultados estão de acordo com Meghwanshi *et al.* (2006), que apresenta dois isolados do gênero *Bacillus* e um isolado do gênero *Pseudomonas* com atividade enzimática ótima a 37°C. Fickers *et al.* (2006) e Kamini *et al.* (2000) também relataram a produção de lipases extracelulares por *Yarrowia lipolytica* e *Cryptococcus* sp., respectivamente, as quais apresentam como temperatura ótima 37°C. Além disso, Abbas *et al.* (2002), Hiol *et al.* (2000) e Rashid *et al.* (2001) encontraram 35°C como temperatura ótima para a atividade lipolítica de lipases isoladas de *Mucor* sp., *Rhizopus oryzae* e *Pseudomonas* sp., respectivamente. A maioria das lipases descritas pelos autores apresenta uma atividade enzimática residual em 55°C, o que não foi verificado para a lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81.

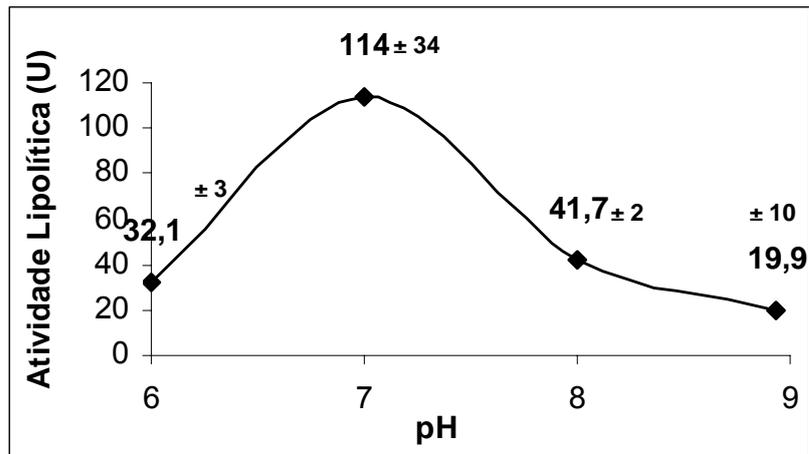
No entanto, a temperatura ótima para a atividade lipolítica varia muito entre as espécies produtoras da enzima e também entre as lipases produzidas por determinado organismo, o que pode ser verificado em vários estudos realizados. Rahman *et al.* (2005) e Kojima *et al.* (2003) encontraram 45°C como temperatura ótima para *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas*

*fluorescens* HU3 80, respectivamente, sendo que a 37 e 55°C ainda verifica-se uma atividade lipolítica residual. Dong *et al.* (1999), encontraram a faixa de temperatura ótima entre 45 e 60°C para *Pseudomonas sp.*, enquanto Litthauer *et al.* (2002) determinou a faixa de 50 a 60°C como temperatura ótima para lipases extraídas de *Pseudomonas luteola*.

A temperatura ótima para a atividade lipolítica de enzimas produzidas por *Candida rugosa* situa-se em torno de 30°C (Yu *et al.*, 2005), sendo muito próxima da temperatura encontrada para a lipase em estudo. Tratando-se de lipases imobilizadas, Nie *et al.* (2006) encontraram a temperatura ótima de 40°C para uma lipase produzida por *Candida sp.* imobilizada em polietilenoglicol, enquanto Ting *et al.* (2006) também descreveram 40°C como a temperatura ótima para a lipase produzida por *Candida rugosa* imobilizada em quitosana.

#### **4.5.2 Determinação do pH ótimo para atividade lipolítica de *Debaryomyces melissophilus* BI81 a 35°C**

Verificou-se que 7,0 corresponde ao melhor pH para a atividade lipolítica da amostra *Debaryomyces melissophilus* BI81, como demonstra a Figura 14 (média do ensaio realizado duas vezes). Nos valores de pH 6,0 e pH 8,0 verifica-se uma atividade enzimática mais baixa, enquanto em pH 9,0 a atividade lipolítica se mostrou nula em um dos ensaios e próxima do valor encontrado em pH 8,0 no outro ensaio.



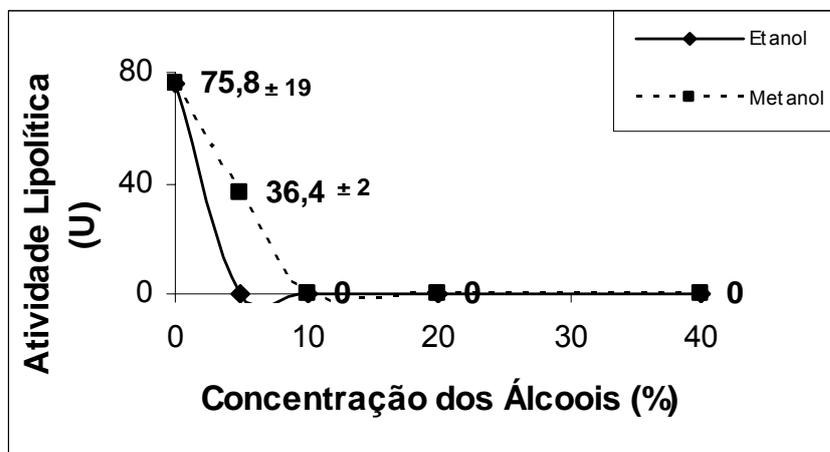
**Figura 14:** Curva de pH para a lipase produzida pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Estes resultados estão de acordo com Abbas *et al.* (2002), Fickers *et al.* (2006) e Kamini *et al.* (2000), que encontraram pH ótimo de 7,0 para a atividade lipolítica de lipases isoladas de *Mucor* sp, *Yarrowia lipolytica* e de *Cryptococcus* sp, respectivamente. Dong *et al.* (1999) encontraram a faixa de 7,0-9,0 como pH ótimo para a atividade lipolítica da enzima isolada a partir de *Pseudomonas* sp., sendo uma faixa maior do que a encontrada para a lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81. Hiol *et al.* (2000) encontrou 7,5 como pH ótimo para atividade lipolítica da lipase de *Rhizopus oryzae*.

#### **4.5.3 Determinação da sensibilidade da enzima produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81 aos álcoois metanol e etanol a 35°C e pH 7,0**

Verificou-se que a lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81 é muito sensível a presença de etanol e metanol em tampão fosfato (pH 7,0), a 35°C, com Tween 80 como fonte de carbono, apresentando baixa atividade lipolítica na concentração de 5 % apenas para metanol, sendo nula

para 5 % de etanol. Em concentrações superiores, nenhuma atividade lipolítica foi encontrada tanto para metanol quanto para etanol (Figura 15).



**Figura 15:** Curva de sensibilidade aos álcoois metanol e etanol para a lipase produzida pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

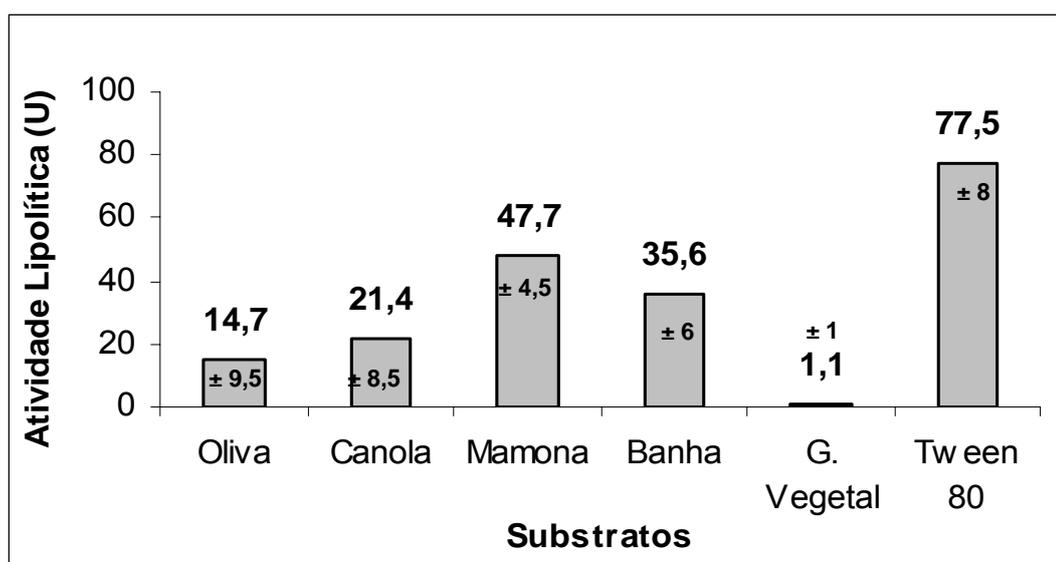
Segundo Kambourouva *et al.* (2003), a presença de 50 % de metanol ou etanol no tampão de incubação da lipase isolada de *Bacillus stearothermophilus* durante 30 minutos, provoca uma redução de aproximadamente 70 % na atividade lipolítica para etanol e de aproximadamente 20 % para metanol. Percebe-se a maior sensibilidade da enzima à presença de etanol, como verificado para a lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81, embora a sensibilidade seja bem menos acentuada.

Resultados bem diferentes foram encontrados por Choo *et al.* (1998), onde a lipase isolada de *Pseudomonas* sp. teve sua atividade lipolítica aumentada na presença de etanol e metanol em concentrações de 15 e 30%, em tampão de incubação durante 1 hora. Há relatos de diversas lipases produzidas pelos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Candida* que têm sua

atividade lipolítica aumentada na presença de solventes orgânicos (Colton *et al.*, 1995; Grochulski *et al.*, 1993; Rahman *et al.*, 2005 & Shimada *et al.*, 1993).

#### 4.5.4 Determinação da especificidade de substrato para a enzima produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81 a 35°C e pH 7,0

Verificou-se que óleo de mamona corresponde ao melhor substrato para a atividade lipolítica da cepa *Debaryomyces melissophilus* BI81 (47,7 U), seguido de banha animal (35,6 U), como demonstra a Figura 16 (média do ensaio realizado duas vezes). O óleo de mamona foi o substrato que chegou mais perto da atividade lipolítica verificada na utilização de Tween 80 como substrato (padrão). Para os substratos azeite de oliva e óleo de canola verificou-se uma atividade lipolítica muito inferior à verificada para o padrão, enquanto o substrato gordura vegetal apresentou atividade lipolítica praticamente nula.



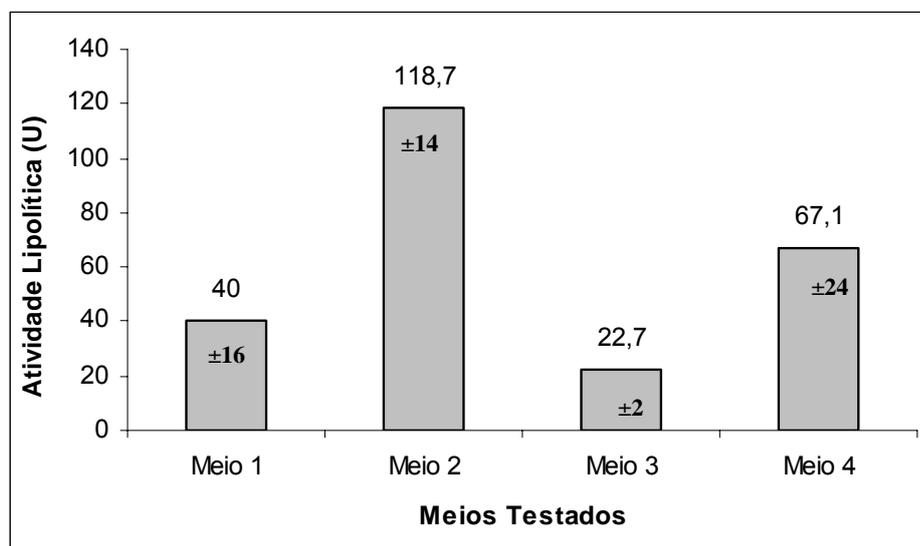
**Figura 16:** Especificidade de substratos para a lipase produzida pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Alguns autores obtiveram resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho para *Debaryomyces melissophilus* BI81, porém para diferentes microrganismos. Para os substratos óleo de canola e azeite de oliva, Abbas *et al.* (2002) e Hiol *et al.* (2000) também encontraram baixa atividade lipolítica ao caracterizar lipases isoladas de *Mucor sp.* e *Rhizopus oryzae*, respectivamente. Saxena *et al.* (2003), ao caracterizarem uma lipase produzida pelo fungo *Aspergillus carneus*, obtiveram alta atividade lipolítica para o óleo de mamona e uma atividade inferior para o substrato banha de porco (utilizando azeite de oliva como padrão).

Por outro lado, Kumar *et al.* (2004) ao caracterizarem uma lipase isolada de *Bacillus coagulans* BTS-3, encontraram baixa atividade lipolítica para o substrato óleo de mamona e maior atividade para o azeite de oliva (utilizando Tween 80 como padrão). Corzo *et al.* (1999), ao caracterizarem uma lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* 681 obtiveram resultados semelhantes a Kumar *et al.* (2004), verificando ainda alta atividade lipolítica na utilização de banha como substrato (superior ao óleo de mamona mas inferior ao azeite de oliva). Este resultado é de grande interesse para a aplicação da enzima na biossíntese do biodiesel, pois o óleo de mamona, composto principalmente pelo ácido ricinoléico, pode ser transformado em biodiesel através de sua transesterificação em presença de etanol ou metanol, utilizando-se a catálise ácida, básica ou uma lipase como catalisador.

#### 4.6 Otimização da produção de lipase pela levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81 através de meios de cultura indutores

Através da avaliação da influência dos quatro meios de cultura testados na atividade lipolítica da levedura *Debaryomyces melissophilus* BI81, foi possível determinar que o meio 2, que utiliza  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  como fonte de nitrogênio inorgânico, extrato de soja como fonte de nitrogênio orgânico, óleo de soja como fonte de carbono e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$  como sais minerais, foi o melhor indutor da atividade lipolítica (Figura 17).



**Figura 17:** Comparação de meios indutores da atividade lipolítica da lipase isolada de *Debaryomyces melissophilus* BI81.

Este meio, desenvolvido por Tianwei et al, 2003, foi utilizado com sucesso na indução da produção de lipase por *Candida sp*, o que demonstra que *Debaryomyces melissophilus* BI81 possui necessidades nutricionais semelhantes às desta levedura. O segundo meio melhor indutor da atividade lipolítica para *Debaryomyces melissophilus* BI81 foi o caldo lipase, utilizado em todos os ensaios de fermentação de nosso estudo.

O meio de cultura número 1, descrito por Kamini *et al.* (2000) para a produção de lipase por *Cryptococcus* sp. S-2, continha tributirina como fonte de carbono, que neste trabalho foi substituída por azeite de oliva, e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Este meio não se mostrou muito eficiente na indução da produção de lipase por *Debaryomyces melissophilus* BI81, demonstrando que as exigências nutricionais desta levedura são diferentes das exigências nutricionais de *Cryptococcus* sp. S-2.

O terceiro meio de cultura testado, desenvolvido por Lakshmi *et al.* (1999) para produção de lipase por *Candida rugosa* (DSM 2031), utilizava uréia como fonte de nitrogênio e azeite de oliva como fonte de carbono. Este meio apresentou pouca eficiência na indução da produção de lipase por *Debaryomyces melissophilus* BI81, sendo menos eficiente que o meio número 1. Percebe-se novamente que as exigências nutricionais de *Debaryomyces melissophilus* BI81 são diferentes daquelas apresentadas por *Candida rugosa* (DSM 2031).

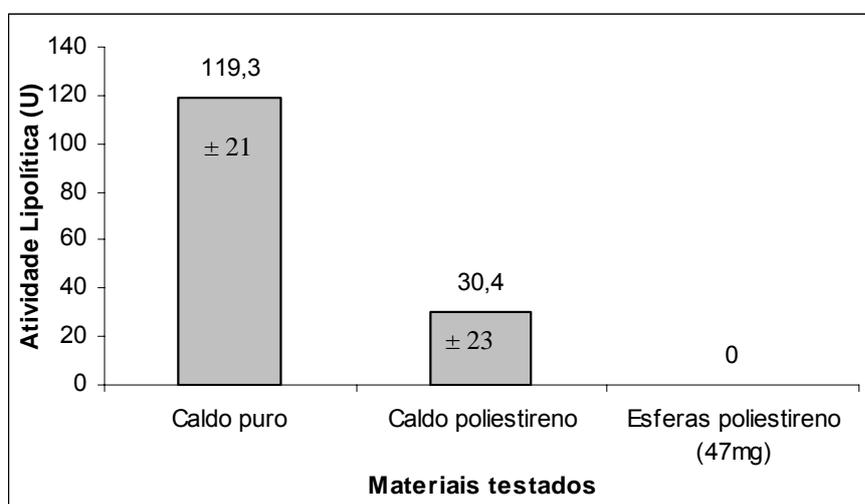
#### **4.7 Imobilização da lipase em materiais poliméricos**

##### **4.7.1 Imobilização da lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81 em caldo contendo poliestireno**

A padronização do inóculo, realizada por espectrofotometria na região do visível em 550 nm, resultou em uma concentração de células média de  $6,1 \times 10^7$  células/mL para o inóculo.

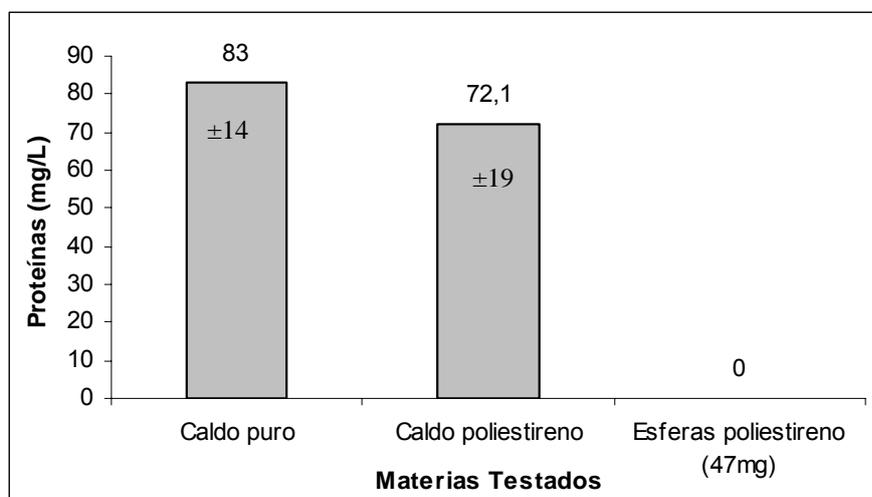
A Figura 18 demonstra a atividade lipolítica apresentada em caldo puro, em caldo contendo o poliestireno em forma de esferas e nas próprias

esferas. É possível perceber, ao se comparar a atividade do caldo puro e do caldo contendo o polímero, que há uma redução na atividade lipolítica no caldo com poliestireno, o que sugere que houve a imobilização de lipases no polímero. Por outro lado, após lavar as esferas de poliestireno com tampão fosfato de potássio pH 7,0 e realizar a dosagem da atividade lipolítica deste tampão, verificou-se atividade lipolítica nula, o que sugere que não houve adsorção das lipases no polímero ou que não foi possível dessorvê-las.



**Figura 18:** Atividade lipolítica da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* B181 em caldo puro e em caldo contendo poliestireno.

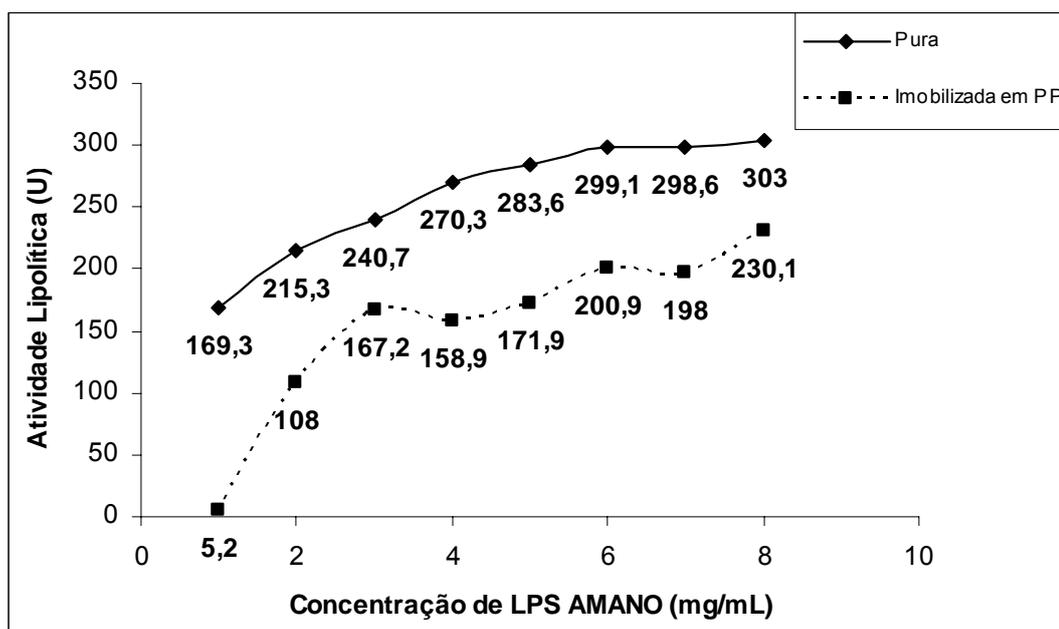
A dosagem de proteínas totais, apresentada na Figura 19, também demonstra que houve uma pequena redução na quantidade de proteínas presentes no caldo contendo o poliestireno em comparação ao caldo puro, o que sugere uma adsorção de lipases no polímero. No entanto, a dosagem de proteínas com o tampão utilizado na lavagem das esferas de poliestireno continuou sendo nula, o que pode ser explicado pela impossibilidade de dessorver a lipase do polímero utilizando o tampão fosfato de potássio pH 7,0, ou pela não imobilização da enzima no suporte.



**Figura 19:** Proteínas totais presentes em caldo puro e em caldo contendo poliestireno, adicionados da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* B181.

#### **4.7.2 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase PS AMANO no polipropileno preparado e determinação de seu ponto de saturação**

Esta técnica foi realizada para comprovar a eficiência do suporte sintetizado utilizando-se uma enzima comercial, com eficiência comprovada. Ao se analisar e comparar as curvas de atividade lipolítica da lipase comercial PS AMANO pura e em contato com o polipropileno poroso expostas na Figura 20, é possível perceber que há uma redução considerável na atividade lipolítica do caldo onde a enzima esteve em contato com o suporte, o que sugere que esta tenha sido adsorvida do meio, ou seja, imobilizada. Além disso, pode-se observar que a atividade lipolítica para o caldo contendo o suporte apresentou variação menos intensa a partir da concentração de 3 mg/mL até a concentração de 7 mg/mL, sendo este seu ponto de saturação.



**Figura 20:** Curvas de atividade lipolítica da lipase PS AMANO pura e imobilizada em PP (remanescente).

Para o ponto de saturação, foi novamente realizada a dosagem da atividade lipolítica e também a dosagem de proteínas, tanto com o caldo contendo a enzima pura quanto com o caldo contendo a enzima e o suporte. Para a atividade lipolítica, obteve-se uma média de 239,5 U para o caldo puro e de 104,7 U para o caldo contendo o suporte, comprovando-se a adsorção da lipase no suporte, devido à redução da atividade lipolítica no caldo remanescente após imobilização. Da mesma forma, para a dosagem de proteínas totais, obteve-se 180,8 mg/L para o caldo puro e 104,8 mg/L para o caldo remanescente após imobilização da lipase, o que reforça a idéia de que a enzima comercial PS AMANO foi imobilizada no suporte sintetizado.

Lipases são proteínas hidrofóbicas que devem ligar-se de forma eficiente ao polímero polipropileno poroso, que também é um substrato caracteristicamente hidrofóbico (Gitlesen *et al.*, 1997). Inúmeros autores relatam a eficiência da imobilização de lipases produzidas por leveduras,

incluindo a própria PS AMANO, em suportes formados por polipropileno poroso, ressaltando as vantagens que a enzima apresenta após imobilização.

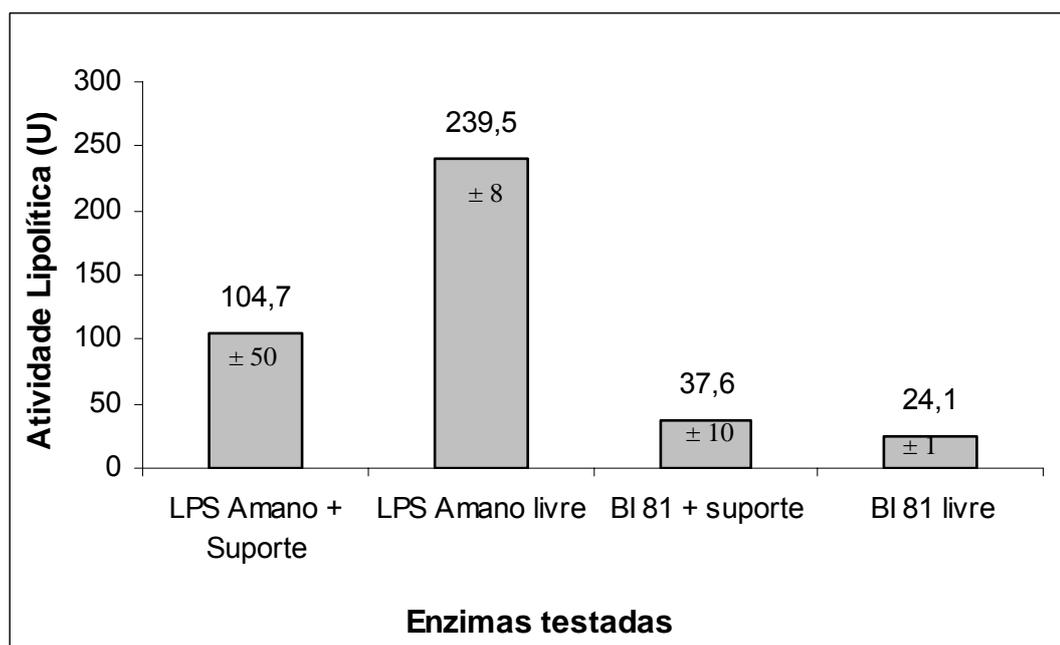
Gitlesen e colaboradores (1997) relataram a imobilização de lipases comerciais obtidas de diversos microrganismos em polipropileno poroso comercial em pó (EP-100), entre elas a PS AMANO produzida por *Pseudomonas fluorescence*, a AY AMANO produzida por *Candida rugosa* e a lipase *H. lanuginosa* produzida por *Humicola lanuginosa*. Determinaram a lipase PS AMANO de *Pseudomonas fluorescence* como a melhor absorvida pelo EP-100. Pencreac'h & Baratti (1997) também estudaram a imobilização da lipase PS AMANO em EP-100 e confirmaram o sucesso da imobilização, sendo que a enzima imobilizada se mostrou mais ativa na hidrólise de ésteres em meio orgânico do que a enzima livre. Panzavolta *et al.* (2005) relataram a eficiência do suporte EP-100 na imobilização da lipase de *Candida rugosa* (CRL), determinando que as enzimas suportadas eram mais eficientes que as enzimas livres e apresentavam maior estabilidade a mudanças de temperatura e pH. Foresti *et al.* (2005) também estudou a imobilização de CRL em polipropileno poroso em pó, obtendo considerável atividade lipolítica e alta estabilidade térmica, embora o padrão Novozyme apresentasse atividade lipolítica maior. Salis *et al.* 2003 avaliaram a eficiência do suporte polipropileno poroso em pó denominado MP1004 testando a imobilização da lipase comercial M AMANO 10, isolada de *Mucor javanicus*, e obtiveram resultados promissores que indicaram a maior atividade da enzima quando imobilizada. Uma vez demonstrada a capacidade do polipropileno poroso frente a uma lipase padrão foi então aplicado o mesmo método para a adsorção preferencial

da enzima bruta do caldo de *Debaryomyces melissophilus* BI81 sobre o polipropileno poroso.

#### **4.7.3 Avaliação da capacidade de imobilização da lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81 no polipropileno poroso preparado**

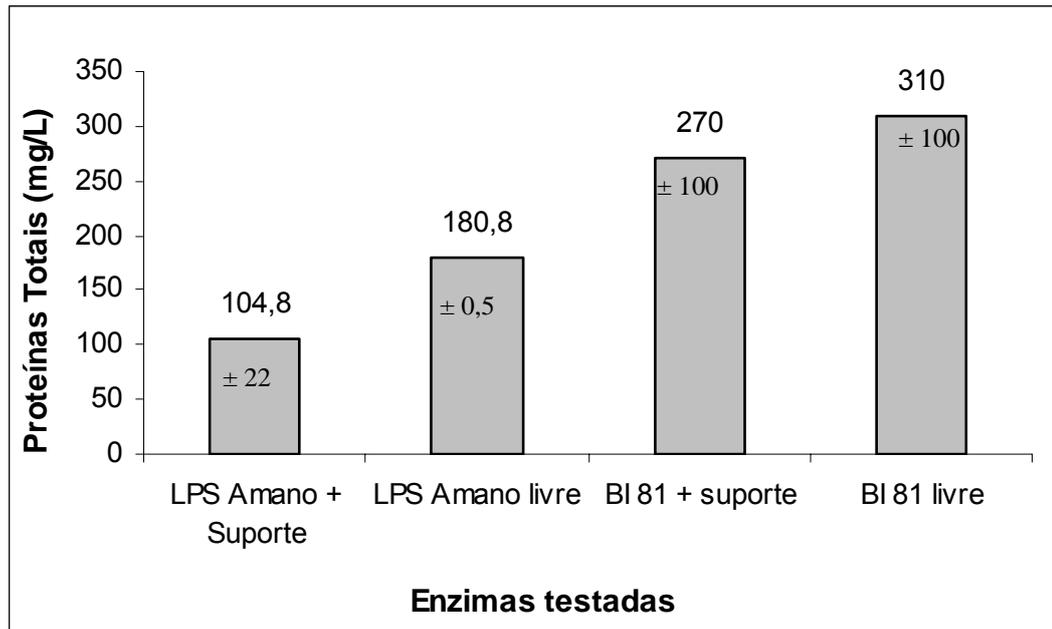
A padronização do inóculo, realizada por espectrofotometria na região do visível em 550nm, resultou em uma concentração de células média de  $3,9 \times 10^7$  células/mL para o inóculo.

Ao avaliar a capacidade de imobilização da lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81, verificou-se que esta não apresentou considerável imobilização no suporte sintetizado, apresentando valores de atividade lipolítica muito próximos para o caldo puro e o caldo contendo o suporte, sendo verificada maior atividade lipolítica para o caldo contendo o polímero. Uma explicação para este fato seria a adsorção de algum componente hidrofóbico do meio no polipropileno, que não a enzima, e que estivesse bloqueando o sítio de ligação da enzima. Com a adsorção preferencial deste componente, o sítio ativo da enzima fica livre aumentando a sua atividade frente ao ensaio com Tween 80. A Figura 21 apresenta a comparação da imobilização da enzima comercial PS AMANO e da enzima produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81, indicando a dificuldade de imobilizar a lipase da levedura em estudo no polímero sintetizado nas condições testadas.



**Figura 21:** Comparação da atividade lipolítica remanescente em caldo contendo a lipase PS AMANO e a lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81, tanto livres quanto imobilizadas.

A dosagem de proteínas totais para a lipase de *Debaryomyces melissophilus* BI81 demonstra uma redução na quantidade de proteínas do caldo remanescente após a imobilização em relação ao caldo puro sem o suporte, o que indica que talvez outros tipos de proteínas que não sejam lipolíticas tenham sido imobilizadas, já que não foi verificada alteração na atividade lipolítica dos mesmos. A Figura 22 apresenta a comparação da dosagem de proteínas para a lipase PS AMANO e para a lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* BI81.



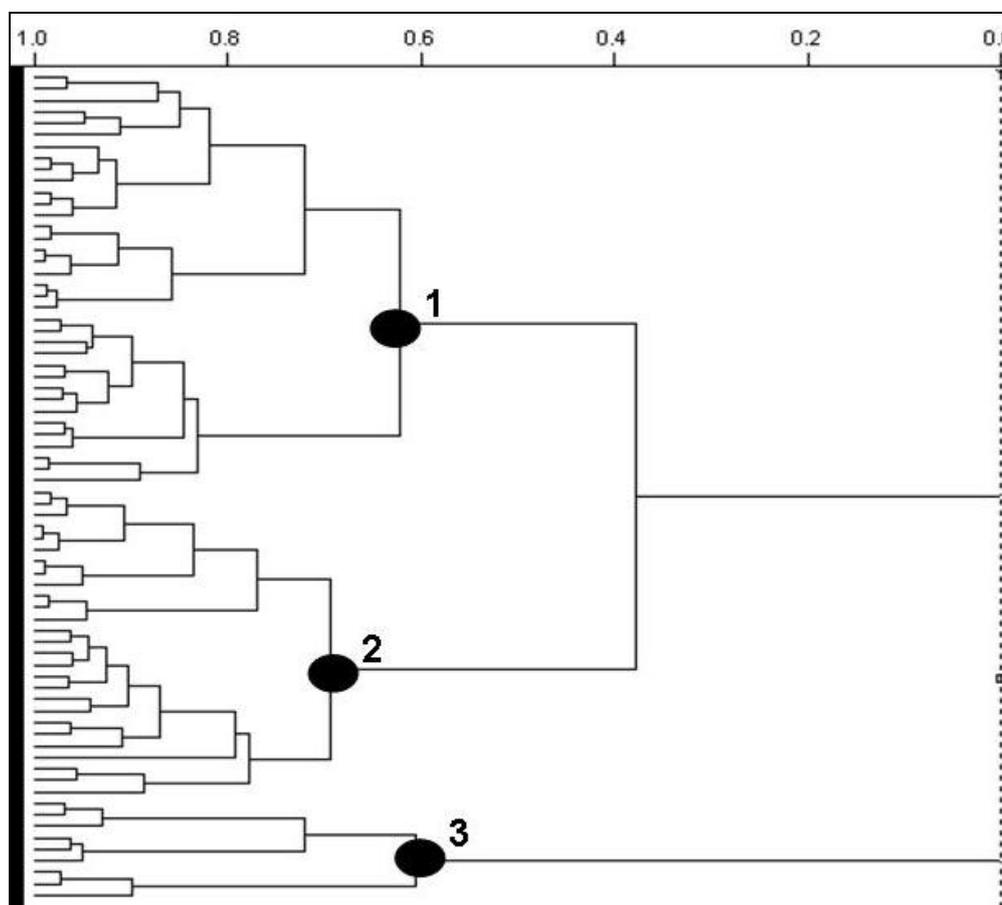
**Figura 22:** Comparação das proteínas totais presentes no caldo contendo a lipase PS AMANO e a lipase produzida por *Debaryomyces melissophilus* B181, tanto livres quanto imobilizadas.

Os dados sugerem que a metodologia baseada na utilização de polipropileno poroso para extrair a enzima bruta do caldo de cultura de *Debaryomyces melissophilus* B181 por adsorção não é um método eficiente possivelmente pela presença no caldo de Tween 80 que compete com o PP para manter a enzima em solução. Este método necessita de otimização.

#### 4.8 Caracterização espectrofotométrica das amostras

Para avaliar a correlação entre os espectros de infravermelho e a atividade lipolítica das amostras incubadas em caldo lipase sem rodamina B, nos três tempos de incubação, foram utilizadas as ferramentas AAH e PLS. O melhor dendograma obtido pela ferramenta AAH utilizou como pré-processamento o autoescalamamento, a distância Euclidiana, o método de ligação Incremental e a transformação de dados MSC. A faixa espectral utilizada foi de

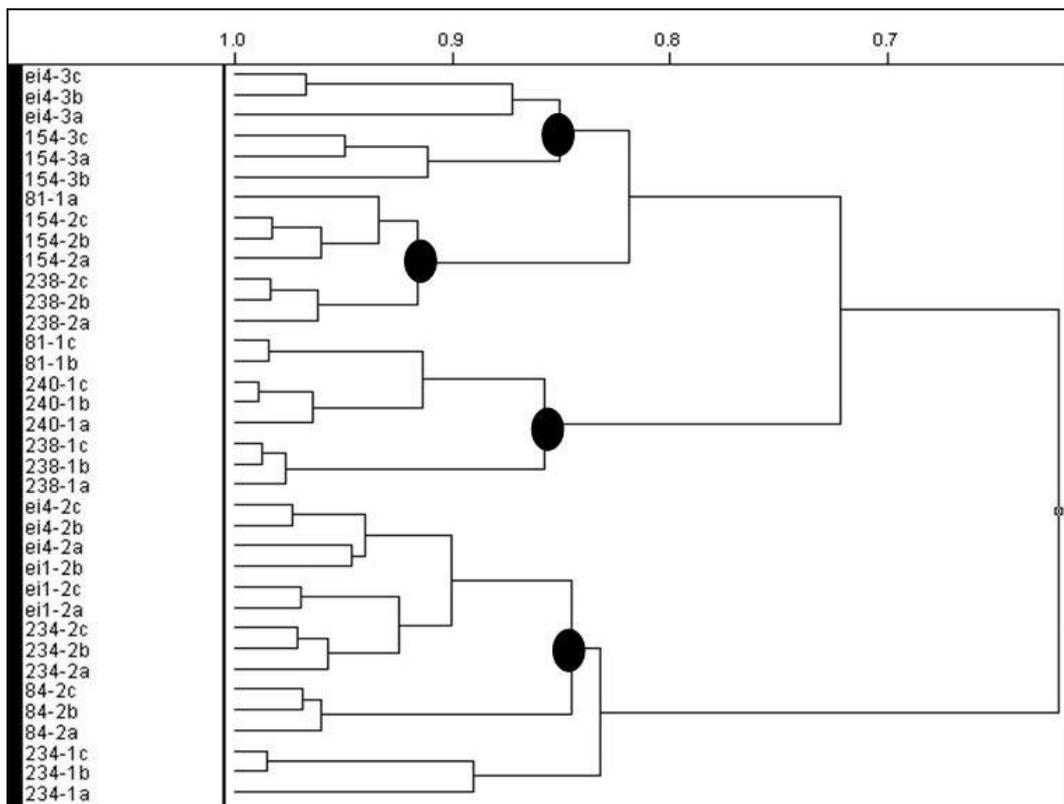
800cm<sup>-1</sup> a 3200cm<sup>-1</sup>. A Figura 23, situada abaixo, demonstra a classificação das amostras em três grandes grupos, os quais se encontram numerados.



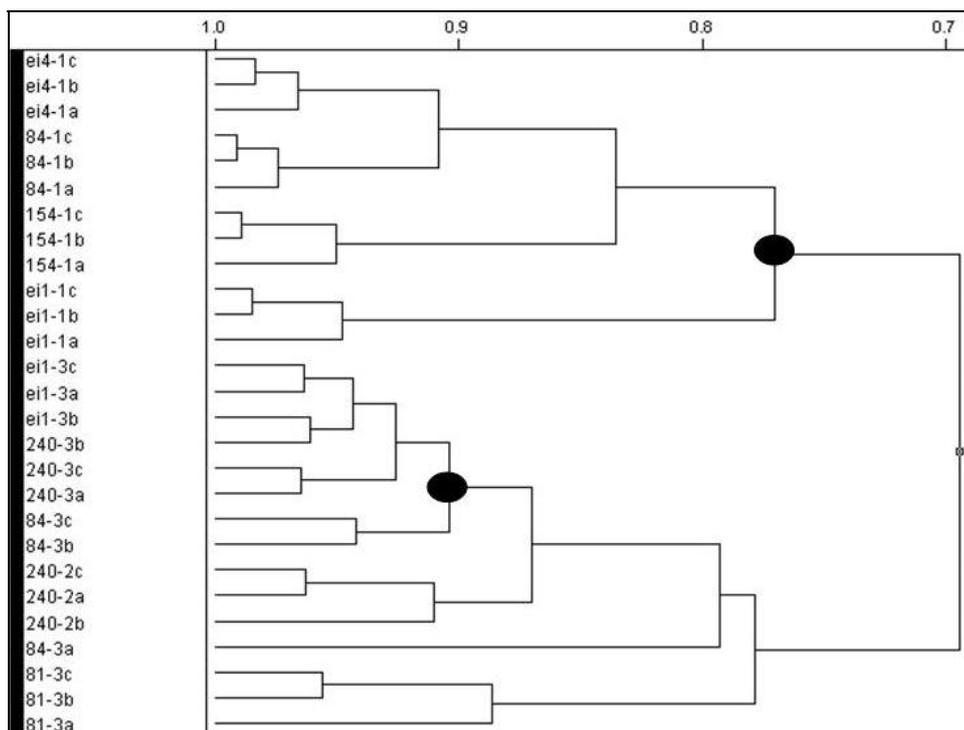
**Figura 23:** Dendrograma para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação.

Ao analisar os grupos 1, 2 e 3 separadamente, os quais estão apresentados nas Figuras 24, 25 e 26, respectivamente, verifica-se o agrupamento das triplicatas das amostras, o que indica a reprodutibilidade das análises. Também é possível perceber que de forma geral não há grande similaridade entre as amostras em função do tempo de incubação, pois cada levedura apresenta características próprias de crescimento, encontrando-se em fases diferentes nos três tempos de incubação. Apesar de não haver a

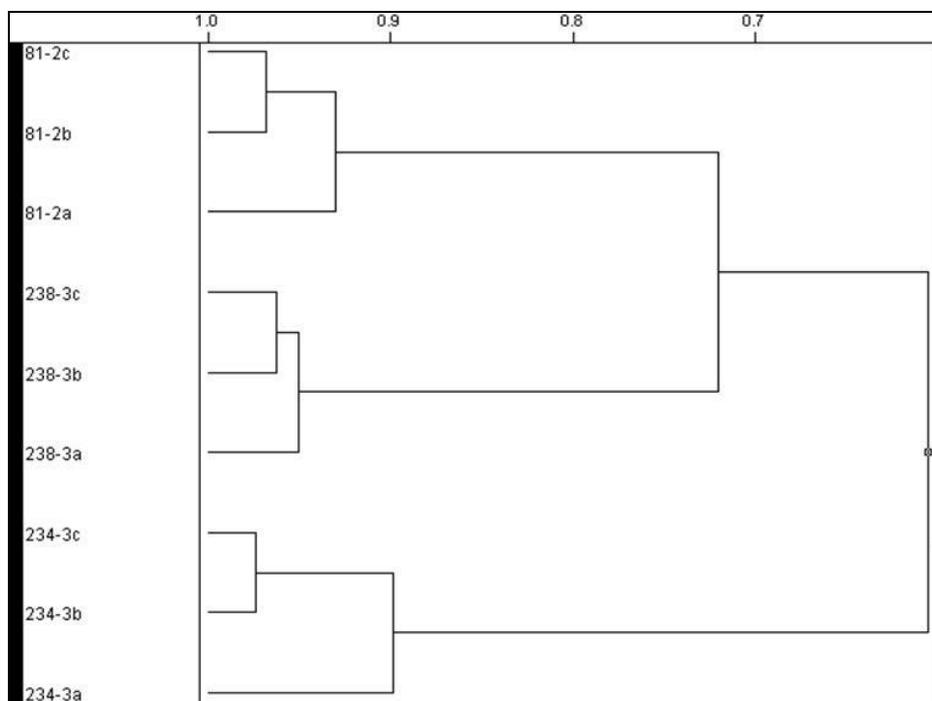
formação de grandes grupos contendo amostras avaliadas no mesmo tempo de incubação, existem pequenos grupos de amostras, com grande similaridade, que foram avaliados no mesmo tempo de incubação. Estes pequenos grupos encontram-se assinalados nas figuras situadas abaixo.



**Figura 24:** Dendrograma parcial, correspondente ao grupo 1, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendrograma correspondem às amostras agrupadas.



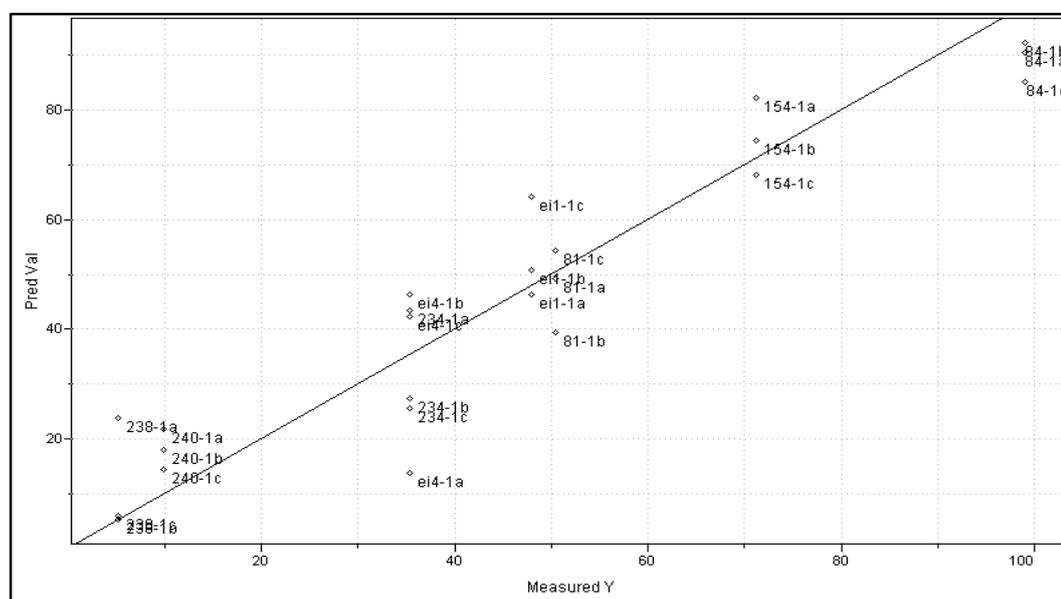
**Figura 25:** Dendrograma parcial, correspondente ao grupo 2, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendrograma correspondem às amostras agrupadas.



**Figura 26:** Dendrograma parcial, correspondente ao grupo 3, para o melhor AAH realizado com as amostras de leveduras nos três diferentes tempos de incubação. Os códigos no canto esquerdo do dendrograma correspondem às amostras agrupadas.

Aqui salienta-se a importância do método de FTIR, o qual demonstra que leveduras de gêneros e espécies diferentes podem se aproximar metabolicamente em diferentes tempos de cultivo. Para a aplicação da ferramenta PLS, separou-se as amostras em três matrizes, cada qual correspondendo a um tempo de incubação. Cada matriz recebeu o tratamento de dados ideal para que se obtivesse o melhor modelo.

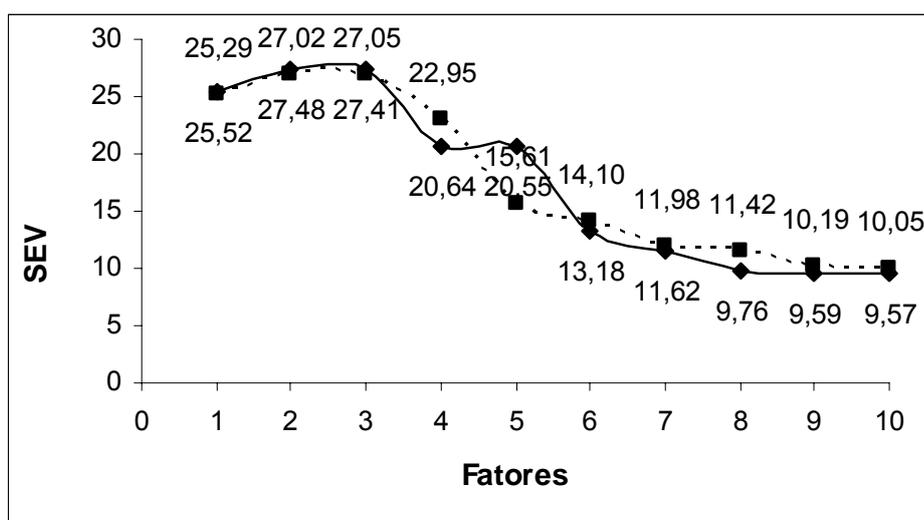
Para o tempo de 24h de incubação, utilizou-se a região espectral entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ , excluindo as faixas de  $1400\text{ cm}^{-1}$  à  $1500\text{ cm}^{-1}$  e de  $2100\text{ cm}^{-1}$  à  $2200\text{ cm}^{-1}$ , o autoescalamento como pré-processamento, o máximo de 10 fatores, a validação cruzada e a transformação dos dados por MSC. A Figura 27 apresenta o modelo de PLS obtido.



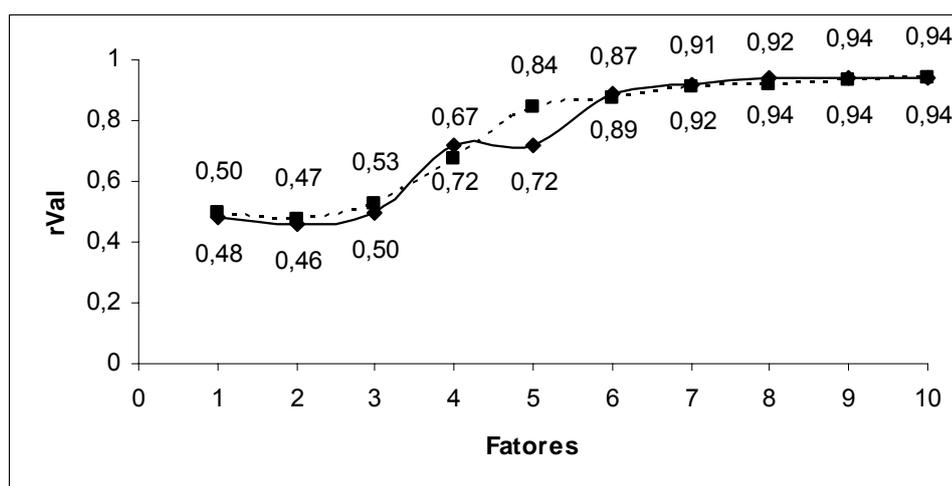
**Figura 27:** Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 24h de incubação.

As Figuras 28 e 29, situadas abaixo, apresentam uma comparação entre o SEV e o rVal do melhor modelo obtido no tempo de 24h (utilizando-se a

região espectral selecionada) e o SEV e o rVal do modelo obtido com toda a faixa do espectro entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Verifica-se a otimização do modelo através da exclusão das faixas de  $1400\text{ cm}^{-1}$ - $1500\text{ cm}^{-1}$  e de  $2100\text{ cm}^{-1}$  a  $2200\text{ cm}^{-1}$ , havendo leve redução no SEV e pequeno aumento no rVal.

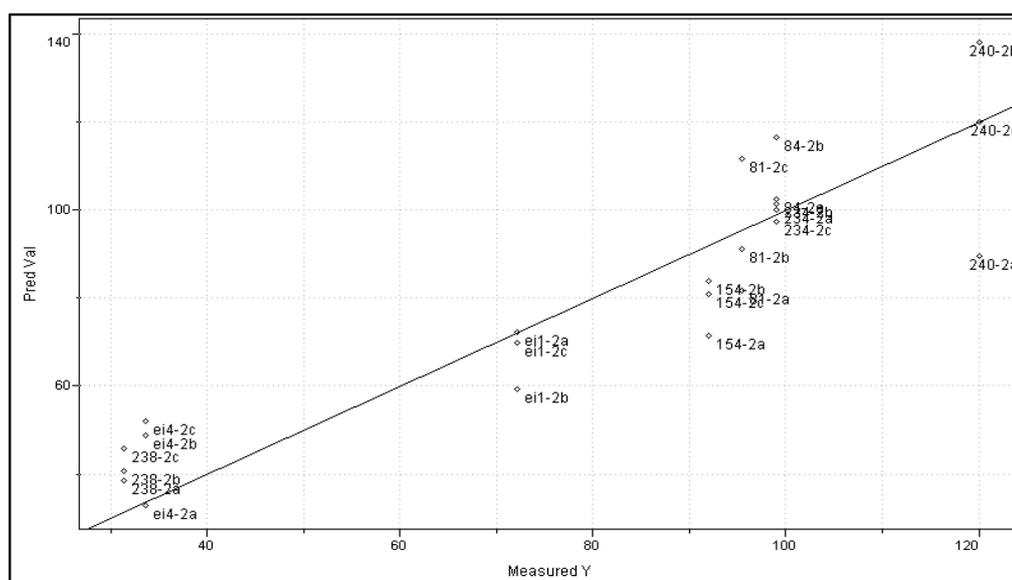


**Figura 28:** Curva comparativa para os valores de SEV dos modelos do PLS otimizado (linha cheia) e não otimizado (linha pontilhada) pela seleção de faixas espectrais em 24h.



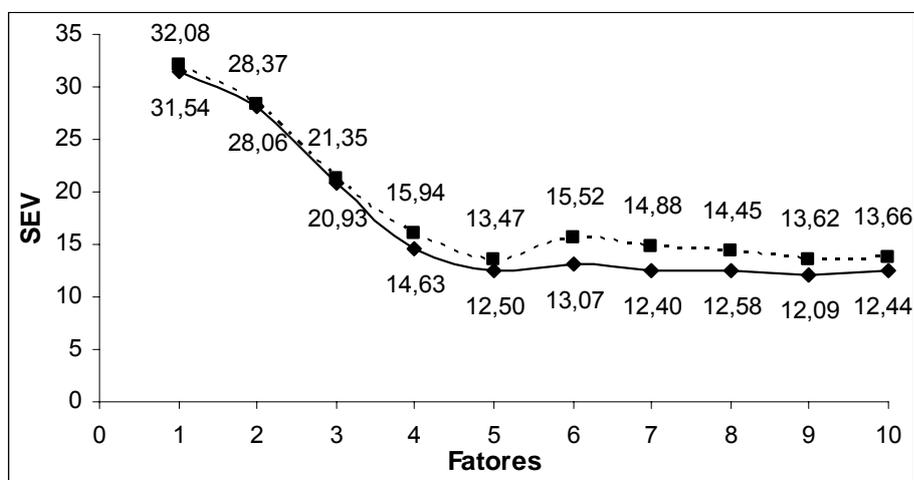
**Figura 29:** Curvas comparativas para os valores de rVal dos modelos do PLS otimizado (linha cheia) e não otimizado (linha pontilhada) pela seleção de faixas espectrais em 24h.

Para o tempo de 48h de incubação, utilizou-se a região espectral entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ , excluindo as faixas de  $1000\text{ cm}^{-1}$  a  $1100\text{ cm}^{-1}$  e de  $2100\text{ cm}^{-1}$  a  $2200\text{ cm}^{-1}$ , o autoescalamamento como pré-processamento, o máximo de 10 fatores, a validação cruzada e a transformação dos dados por MSC. A curva apresentada na Figura 30 demonstra que o modelo de PLS obtido para o tempo de 48h de incubação proporciona uma correlação linear menos eficiente que a obtida pelo modelo feito em 24h de incubação, pois em 48h as amostras encontram-se mais dispersas no gráfico. Em 24h de incubação, as células se encontram no mesmo estágio metabólico (metabolicamente ativas), sendo esta fase correspondente a fase log. Já em 48h as células se encontram em estágios metabólicos diferentes, pois algumas continuam ativas e outras podem estar parando de se multiplicar, correspondendo à fase estacionária da curva de crescimento. Isso poderia explicar a correlação mais eficiente encontrada no tempo de 24 horas.

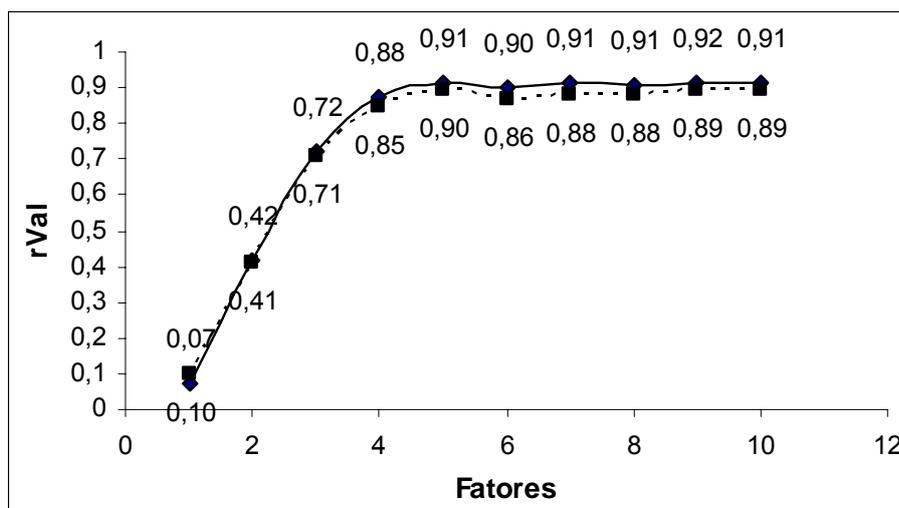


**Figura 30:** Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 48h de incubação.

As Figuras 31 e 32, situadas abaixo, apresentam uma comparação entre o SEV e o rVal do melhor modelo obtido no tempo de 48h (utilizando-se a região espectral selecionada) e o SEV e o rVal do modelo obtido com toda a faixa do espectro entre 800  $\text{cm}^{-1}$  e 3200  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Verifica-se a otimização do modelo através da exclusão das faixas de 1000  $\text{cm}^{-1}$ -1100  $\text{cm}^{-1}$  e de 2100-2200  $\text{cm}^{-1}$ , havendo leve redução no SEV e pequeno aumento no rVal. Além disso, percebe-se que ao compararmos os resultados de SEV e rVal dos modelos gerados para os tempos de 24h e 48h de incubação, comprova-se a maior correlação existente no primeiro modelo, onde SEV possui valor menor e rVal valor maior.

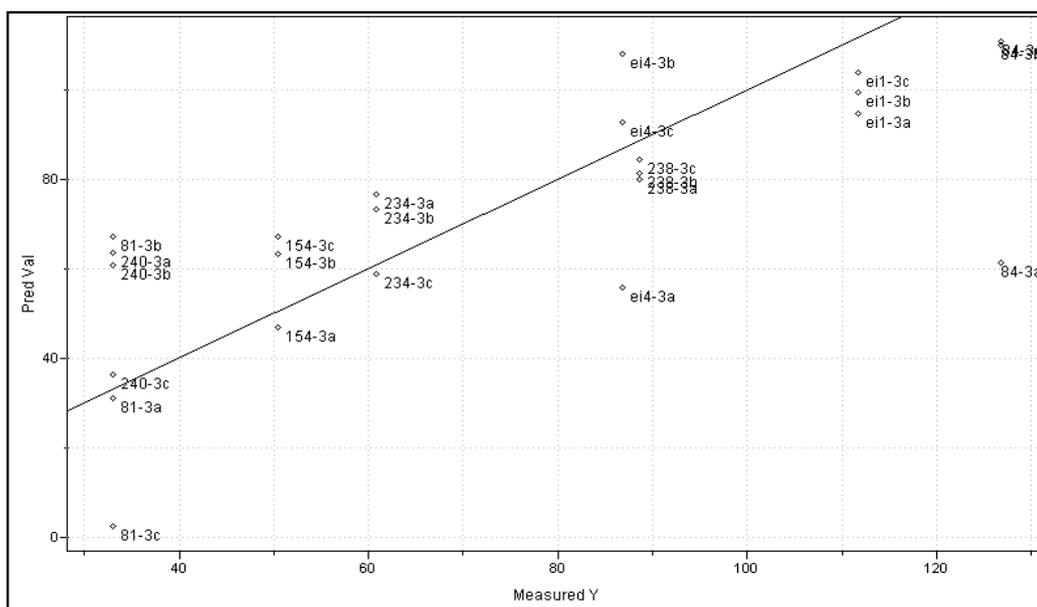


**Figura 31:** Curva comparativa para os valores de SEV dos modelos do PLS otimizado (linha cheia) e não otimizado (linha pontilhada) pela seleção de faixas espectrais em 48h.



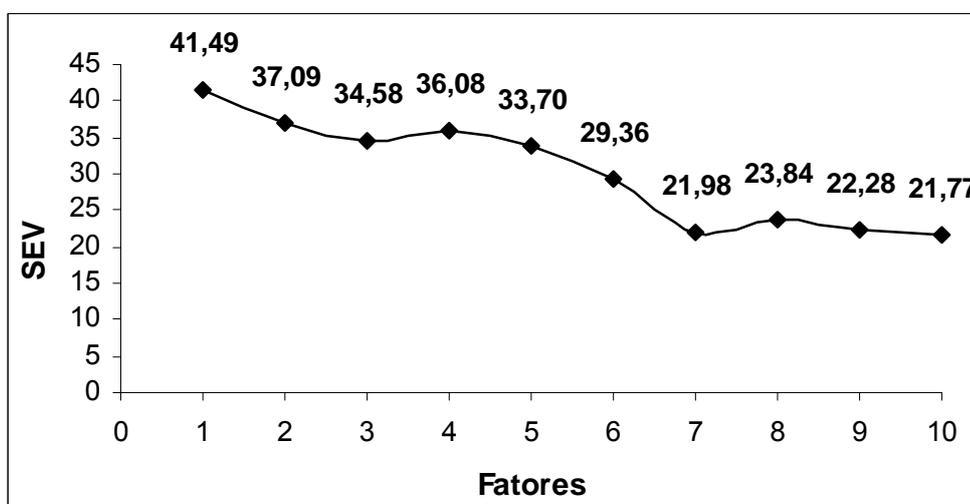
**Figura 32:** Curva comparativa para os valores de rVal dos modelos do PLS otimizado (linha cheia) e não otimizado (linha pontilhada) pela seleção de faixas espectrais em 48h.

Para o tempo de 72h de incubação, utilizou-se a região espectral entre  $800\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$  (sem exclusões), o autoescalamento como pré-processamento, o máximo de 10 fatores, a validação cruzada e a transformação dos dados por MSC. A Figura 33 apresenta o modelo de PLS obtido, demonstrando que para este tempo de incubação a correlação linear existente entre os dados espectrofotométricos e de atividade lipolítica é ainda menor do que a verificada para o tempo de 48h, pois as amostras encontram-se ainda mais dispersas.

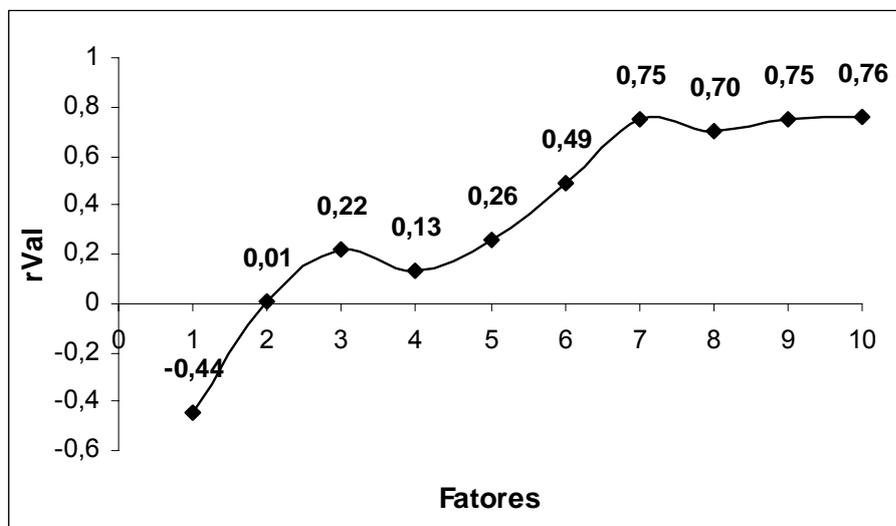


**Figura 33:** Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para o melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas sem rodamina no período de 72h de incubação.

Ao avaliar-se os gráficos de SEV e rVal, expostos nas Figuras 34 e 35, respectivamente, verifica-se novamente que o modelo de PLS obtido para o tempo de 72h é menos eficiente do que os outros dois modelos obtidos para 24h e 48h de incubação, pois os valores de SEV são maiores e os valores de rVal menores que os obtidos para os modelos descritos anteriormente.

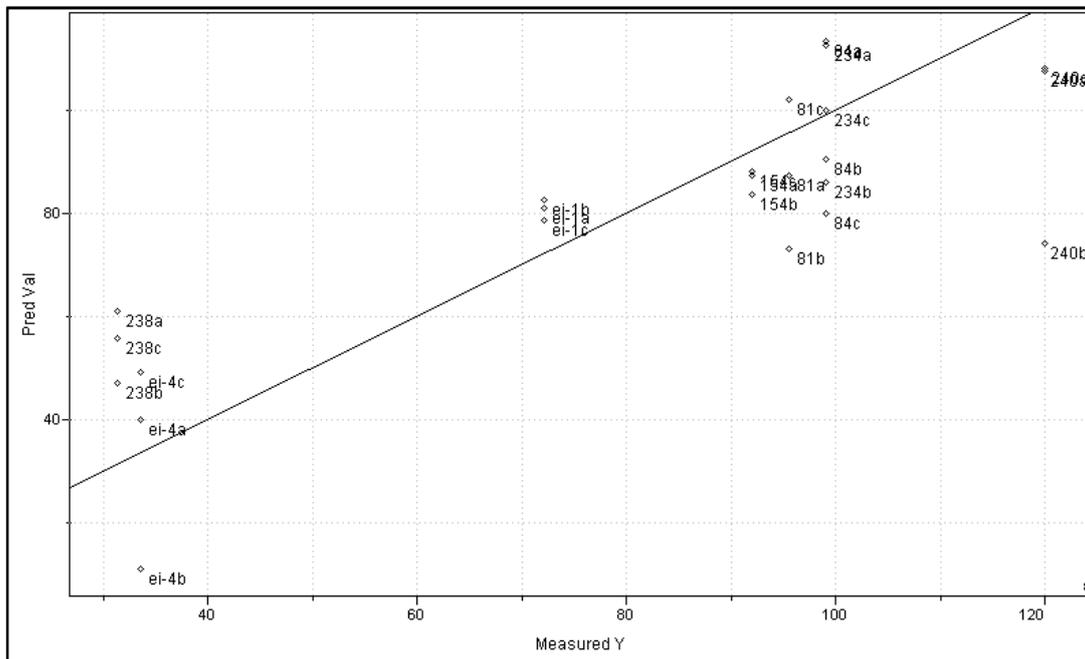


**Figura 34:** Curva de SEV para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas sem rodamina em 72h de incubação.



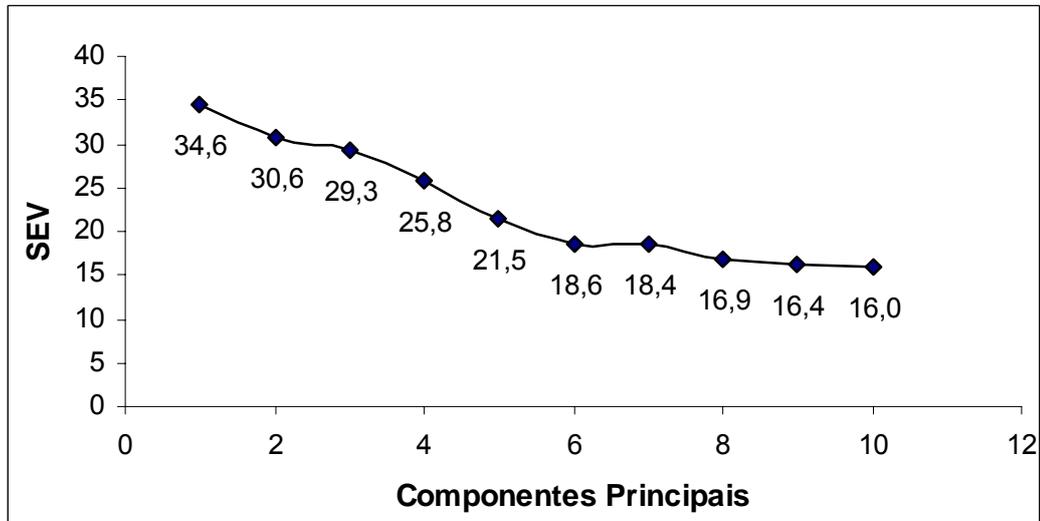
**Figura 35:** Curva de rVal para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas sem rodamina em 72 de incubação.

Através da caracterização das amostras incubadas em ágar com rodamina, pode-se verificar que não é possível a obtenção de um modelo de PLS satisfatório, pois não há uma boa correlação entre as amostras. O melhor modelo de PLS obtido corresponde ao que correlaciona os espectros com a atividade lipolítica medida em 48h de incubação, utilizando-se o pré-processamento centrado na média, o máximo de 10 fatores, a validação cruzada e a transformação dos dados por MSC (correção do espalhamento de luz) (Figura 36). A faixa espectral selecionada para o estudo foi de  $800\text{cm}^{-1}$  à  $3200\text{cm}^{-1}$ , excluindo-se as faixas de  $1300\text{-}1400\text{cm}^{-1}$ ,  $2000\text{-}2100\text{cm}^{-1}$  e  $2500\text{-}2600\text{cm}^{-1}$ .

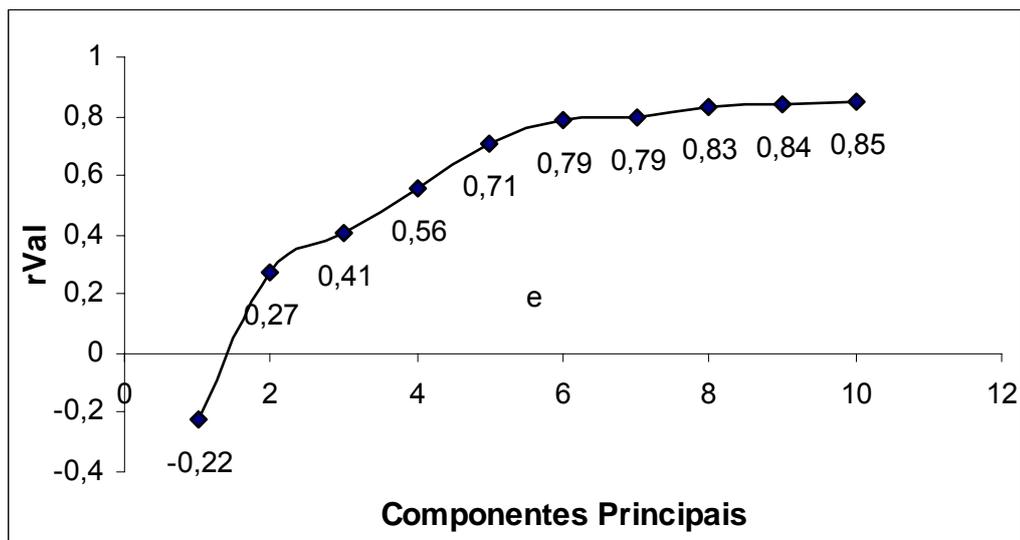


**Figura 36:** Curva de correlação entre valor predito e valor calculado para do melhor modelo de PLS obtido para as amostras cultivadas na presença de rodamina no período de 48h de incubação.

Embora este seja o melhor modelo obtido, os valores de SEV (erro padrão de validação cruzada) e rVal (coeficiente de correlação) indicam que o modelo de PLS não se encontra adequado para que seja utilizado na classificação e caracterização das amostras através da correlação de seus espectros e de suas atividades lipolíticas em 48h de incubação. Percebe-se que o SEV atinge valores muito altos (Figura 37), o que sugere grande erro na modelagem, enquanto o rVal atinge valores relativamente baixos (inferiores a 0,9 de correlação), comprovando a ineficiência do modelo (Figura38).



**Figura 37:** Curva de SEV para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas na presença de rodamina em 48h de incubação.



**Figura 38:** Curva de rVal para o melhor modelo de PLS realizado com as amostras cultivadas na presença de rodamina em 48h de incubação.

Percebe-se que a inserção de rodamina B no meio de cultura dificulta a modelagem através da utilização da ferramenta PLS para o conjunto de dados analisado, tornando as variáveis muito complexas e impossibilitando a utilização de uma ferramenta matemática baseada em regressão linear. Sendo assim, não foi observada a correlação entre os métodos de determinação de

atividade lipolítica baseados na titrimetria e na fluorimetria utilizando rodamina, o que pode ser explicado pela interferência do corante nos espectros, tornando a correlação entre os métodos não linear. A ferramenta PLS trabalha os dados através de regressão linear, o que poderia torná-la inadequada para esta análise.

## 5 CONCLUSÕES

Cinquenta e seis amostras de leveduras isoladas de folhas de bromélias do Parque de Itapuã foram testadas em relação à atividade lipolítica, sendo a amostra *Debaryomyces melissophilus* B181 foi selecionada como a melhor produtora de lipase.

O método de triagem de leveduras lipolíticas utilizado, baseado no crescimento em Tween 20 como única fonte de carbono seguido pela técnica da fluorimetria com rodamina B, se mostrou adequado para identificar leveduras com potencial lipolítico.

A levedura *Debaryomyces melissophilus* B181 produz lipase extracelular com características de uma lipase neutra mesofílica com dependência de fatores nutricionais semelhante à *Candida* sp e com baixa estabilidade frente aos solventes de transesterificação metanol e etanol, porém com maior especificidade de substrato para o óleo de mamona tornando-se atrativa para aplicação na obtenção de biodiesel a partir deste óleo. São

necessários estudos de otimização de condições de fermentação para melhorar a produção e a purificação desta enzima uma vez que a interação hidrofóbica com polipropileno poroso ainda se encontra pouco eficiente.

Comprovou-se a eficiência do polímero polipropileno poroso, usado como suporte para lipases, através da imobilização da lipase comercial PS AMANO. No entanto, não foi possível imobilizar a enzima produzida por *Debaryomyces melissophilus* B181 nas condições testadas, sendo necessárias pesquisas futuras sobre os demais constituintes do meio reacional, como compostos hidrofílicos ou hidrofóbicos, que possam influenciar na adsorção da enzima ao suporte.

A técnica de FT-IR acoplada à quimiometria mostrou-se adequada para diferenciar as amostras de leveduras quanto ao seu perfil de impressão digital metabólico, porém não em relação ao tempo de cultivo.

A utilização da ferramenta quimiométrica PLS se mostrou ineficiente na correlação de dados espectrofotométricos e de atividade lipolítica para leveduras cultivadas na presença de rodamina B, o que indica que este agente fluorimétrico torna os dados complexos demais para que sejam analisados por regressão linear. Entretanto, o modelo obtido quando as leveduras foram cultivadas em caldo lipase sem rodamina B foi mais adequado para correlacionar os dados de impressão digital metabólica com os valores de lipase extracelular obtido no tempo de 24h de incubação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. *et al.* Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, 968–975, 2002.

AIDOO, K.E., *et al.* Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 6, p. 30-39, 2006.

AKOH, C.C. *et al.* F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. **Lipids**, Champaign, v. 39, p. 513-526, 2004.

AL-HOLY, M.A. *et al.* The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. **Food Microbiology**, London, v. 23, 162–168, 2006.

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

BRERETON, Richard G. **Chemometrics – Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 489p, 2003.

BITTNER, A. *et al.* Multivariate calibration for protein, cholesterol and triglycerides in human plasma using short-wave near infrared spectrometry. **Journal of Molecular Structure**, v. 349, p. 341– 344, 1995.

BROCCA, S. *et al.* Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Protein Science**, New York, v. 12, p. 2312-2319, 2003.

BOER, E. *et al.* An extracellular lipase from the dimorphic yeast *Arxula adenivorans*: molecular cloning of the ALIP1 gene and characterization of the purified recombinant enzyme. **Yeast**, Chichester, v. 22, p. 523-535, 2005.

BRUNEL, L. *et al.* High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 111(1), p. 41-50, 2004.

CASTILLO, B. *et al.* On the activity loss of hydrolases in organic solvents I. Rapid loss of activity of a variety of enzymes and formulations in a range of organic solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v.35, p. 147–153, 2005.

CHOO, W.C. *et al.* Cold-Adapted Lipase of an Alaskan Psychrotroph *Pseudomonas* sp. Strain B11-1: Gene Cloning and Enzyme Purification and Characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 486– 491, 1998.

CHOO-SMITH, L.P. *et al.* Investigating Microbial (Micro)colony Heterogeneity by Vibrational Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.1461-1469, 2001.

CHANG, S.W. *et al.* Multiple mutagenesis of the *Candida rugosa* LIP1 gene and optimum production of recombinant LIP1 expressed in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, 67, p. 215-224, 2005

CHANG, S.W. *et al.* Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified enzyme. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 54, p. 5831-5838, 2006a.

CHANG, S.W. *et al.* Codon optimization of *Candida rugosa* lip1 gene for improving expression in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of the purified recombinant LIP1 lipase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 54, p. 815-822, 2006b.

CIAFARDINI, G. *et al.* Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**, London, v. 23, p. 60-67, 2006a.

CIAFARDINI, G. *et al.* Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, p. 27-32, 2006b.

COLTON, I. J. *et al.* 2-Propanol Treatment Increases the Enantioselectivity of *Candida rugosa* Lipase toward Esters of Chiral Carboxylic Acids. **Journal of Organic Chemistry**, Columbus, v. 60, p. 212 – 217, 1995.

CORZO, G. & REVAH, S. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**, Essex, v. 70, p. 173-180, 1999.

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

D'ANNIBALE, A. *et al.* Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, p. 1828-1833, 2006.

DE MARIA, P.D *et al.* Rational strategy for the production of new crude lipases from *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 499-503, 2005.

DE MARIA, D. *et al.* Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, p. 180-196, 2006.

DECAGNY, B. *et al.* Synthesis of wax ester through triolein alcoholysis: Choice of the lipase and study of the mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 22, p. 578-582, 1998.

DEGN, P. *et al.* Two-step enzymatic synthesis of maltooligosaccharide esters. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 329, p. 57-63, 2000.

DEIVE, F.J. *et al.* Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, p. 1403-1406, 2003.

DESTAIN, J. *et al.* Utilization of methyloleate in production of microbial lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 121-124, p. 269-277, 2005.

DONG, H. *et al.* Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. Lipase and its properties in non-aqueous media. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 30, p. 251-256, 1999.

DÖRMO, N. *et al.* Manufacture of an environmental-safe biolubrificant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent free system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 21, p. 229-234, 2004.

DU, W. *et al.* Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 30, p. 125-129, 2004.

ESCANDAR, G.M. *et al.* A review of multivariate calibration methods applied to biomedical analysis. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 82, p. 29-42, 2006.

FERNÁNDEZ, L. *et al.* Cloning, Characterization, Controlled Overexpression, and Inactivation of the Major Tributyrin Esterase Gene of *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.4, p. 1360-1368, 2000.

FERNANDEZ, L. *et al.* High-level expression and characterization of *Galactomyces geotrichum* (BT107) lipase I in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 49, p. 256-264, 2006.

FERRÃO, M.F. Técnicas de Reflexão no Infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v. 5, p. 63-85, jan./jun. 2001.

FERRÃO, M.F. Análise exploratória aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v. 7, p. 69-88, jan./jun. 2003.  
FERRÃO, M.F. Determinação simultânea dos teores de cinza e proteína em farinha de trigo empregando NIR-PLS e DRIFT-PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.4, p. 333-340, 2004.

FERREIRA, M.M.C. Multivariate QSAR. **Journal of Brazilian Chemistry Society**. São Paulo, v.13, p. 742-753, nov. 2002.

FERRER, P. *et al.* Production of native and recombinant lipases by *Candida rugosa*: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 95, p. 221-255, 2001.

FICKERS, P. *et al.* Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 63, p. 136-142, 2003.

FICKERS, P. *et al.* Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, p. 742-749, 2004.

FICKERS, P. *et al.* Methyl oleate modulates LIP2 expression in the lipolytic yeast *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 27, p. 1751-1754, 2005a.

FICKERS, P. *et al.* Involvement of hexokinase Hxk1 in glucose catabolite repression of LIP2 encoding extracellular lipase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Current Microbiology**, New Yor, v. 50, p. 133-137, 2005b.

FICKERS, P. *et al.* Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 115, p. 379-386, 2005c.

FICKERS, P. *et al.* Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 756–759, 2006.

FILIP, Z. & HERMANN, S. An attempt to differentiate *Pseudomonas* spp. and other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. **European Journal of Biochemistry**, London, v. 37, p. 137-143, 2001.

FUH LIN, S. *et al.* Purification and Partial Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1093–1095, 1996.

FUJINO, S. *et al.* Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*. [Bioscience, Biotechnology and Biochemistry](#), Tokyo, v. 70, p. 377-386, 2006.

GELLISSEN, G. *et al.* New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – a comparison. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 5, p. 1079-1096, 2005.

GELINAS, P. & BARRETTE, J. Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1138-1143, 2007.

GILHAM, D. & LEHNER, R. Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. **Methods**, Amsterdam, v. 36, p. 139-147, 2005.

GITLESEN, T. *et al.* Adsorption of lipase on polypropylene powder **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1345, p.188–196, 1997.

GROCHULSKI, P. *et al.* Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 268, p. 12843-12847, 1993.

GUIBET, F. *et al.* Discrimination and classification of Enterococci by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 33, p. 133–142, 2003.

GUPTA, R. *et al.* Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 37, p. 63-71, 2003.

HATZINIKOLAOU, D.G. *et al.* A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 88, p. 53-6, 1999.

HAWKSWORTH, D.L. *et al.* **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, Wallingford: Ed. CAB International, 8<sup>a</sup> edição, 616 p, 1995.

HENNE, A. *et al.* Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. n. 7, p. 3113-3116, 2000.

HOLMQUIST, M. Insights into the molecular basis for fatty acyl specificities of lipases from *Geotrichum candidum* and *Candida rugosa*. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 93, p. 57-66, 1998.

HOLT, C. *et al.* Discrimination of Species in the Genus *Listeria* by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Canonical Variate Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.1, p. 377-378, 1995.

IONITA, A. *et al.* Screening of yeast and fungal strains for lipolytic potential and determination of some biochemical properties of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 3, p. 147–151, 1997.

ISO, M. *et al.* Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 16, p. 53-58, 2001.

JAMES, J.J. *et al.* Insights from molecular dynamics simulations into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibuprofen esters by *Candida rugosa* lipase. **Protein Engineering**, Oxford, v. 16(12), p. 1017-1024, 2003.

JETTE, J. F. & ZIOMEK, Z. **Analytical Biochemistry**, Amsterdam, v. 219, p. 256–260, 1994.

JANDROSITZ, A. *et al.* The lipid droplet enzyme tgl1p hydrolyzes both steryl esters and triglycerides in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1735(1), p. 50-58, 2005.

KAIEDA, M. *et al.* Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed *Rhizopus oryzae* in a water-containing system without an organic solvent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 88, p. 627-631, 1999.

KAIEDA, M. *et al.* Effect of Methanol and Water Contents on Production of Biodiesel Fuel from Plant Oil Catalyzed by Various Lipases in a Solvent-Free System. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 91, p. 12-15, 2001.

KAKUGAWA, K. *et al.* Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. [Bioscience, Biotechnology and Biochemistry](#), Tokyo, v. 66(5), p. 978-985, 2002.

KAMBOUROVA, M. *et al.* Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 307–313, 2003.

KAMINI, N. R. *et al.* Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 36, p. 317–324, 2000.

KANG, I.J. *et al.* Real time measurement and control of thermodynamic water activities for enzymatic catalysis in hexane. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 119, 2, p. 147 – 154, 2005.

KANSIZ, M. *et al.* Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 8, p. 3415-3420, ago. 2000.

KAYIRHAN, F. & ÇELEBI, S. S. Increase in the enzymatic hydrolysis rate of triacetin using polyethylene particles packed in a column reactor. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 1, p. 153-158, 1998.

KIM, B.S. & HOU, C.T. Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Candida cylindracea*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Berlin, v. 29, p. 59-64, 2006.

KIRSCHNER, C.; *et al.* Classification and Identification of *Enterococci*: a Comparative Phenotypic, Genotypic, and Vibrational Spectroscopic Study. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, n. 5, p. 1763-1770, 2001.

KOJIMA, Y. & SHIMIZU, S. Purification and Characterization of the Lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU3 80. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 219-226, 2003.

KOLOSSVÁRY, G. J. Optimization of Lipase Activity from *Rhizopus* sp. in Triglyceride Hydrolysis Using a Modified Simplex Method. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 31, p. 595-600, 1996.

KOSE, O. *et al.* Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83(2), p. 125-129, 2002.

KOUKER, G. & JAEGER, K.E. Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, n.1, p. 211-213, 1987.

KUMAR, R. *et al.* Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 23, p.199-202, 2005.

KUMAR, S. *et al.* Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 41, p. 38-44, 2005.

KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. **The Yeasts, A Taxonomic Study**, 4<sup>a</sup> edição, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1055 p, 1998.

LAKSHMI, B. S. *et al.* Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, p. 66-70, 1999.

LANCIOTTI, R. *et al.* Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive Mill wastewater. **Bioresource Biotechnology**, Essex, v. 96(3), p. 317-322, 2005.

LARIOS, A. *et al.* Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 65(4), p. 373-376, 2004.

LEE, G.C. *et al.* Multiple mutagenesis of non-universal serine codons of the *Candida rugosa* LIP2 gene and biochemical characterization of purified recombinant LIP2 lipase overexpressed in *Pichia pastoris*. **Biochemical Journal**, California, v. 366, p. 603-611, 2002.

LIN, M. *et al.* Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, p. 369– 376, 2005.

LIN, S. *et al.* Purification and Partial Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 3, p. 1093-1095, 1996.

LITTHAUER, D. *et al.* *Pseudomonas luteola* lipase: A new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, p. 209–215, 2002.

LOCK, L.L. *et al.* **Classificação de microrganismos através da espectrofotometria de infravermelho utilizando ferramentas quimiométricas.** XII Encontro de Química da Região Sul. Guarapuava: UNICENTRO, 2004.

LOPES, J.A. *et al.* Multiblock PLS Analysis of an Industrial Pharmaceutical Process. **Biotechnology and Bioengineering**, Indianapolis, v. 80, p. 419-427, 2002.

LOPEZ, N *et al.* Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (lip1, lip2 and lip3) in aqueous and organic media. **Biotechnology Progress**, Columbus, v. 20, p. 65-73, 2004.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUGINBÜHL, W. *et al.* Identification of seven species of the *Lactobacillus acidophilus* group by FT-IR spectroscopy. **Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 39, p. 152–158, 2006.

MAGNUSSON, A.O. *et al.* Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 6, p. 1051-1056, 2005.

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

MARÍA, P. D. *et al.* Biotechnological applications of *Candida Antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 37, p. 36–46, 2005.

MASAKI, K. *et al.* Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71(11), p. 7548-7550, 2005.

MCCABE, R. W. & TAYLOR, A. Synthesis of novel polyurethane polyesters using the enzyme *Candida antarctica* lipase B. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 7, p. 934-935, 2002.

MEGHWANSHI , G. K. *et al.* Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 40, p. 127–131, 2006.

MORENO-ARRIBAS M.V. & POLO M.C. Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Amsterdam, v. 45, p. 265-286, 2005.

HIOL, A. *et al.* Purification and characterization of an extracellular lipase from athermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 421-430, 2000.

MILETO, D. *et al.* Characterization of the *Candida rugosa* lipase system and overexpression of the lip1 isoenzyme in a non-conventional yeast. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 93, p. 47-55, 1998.

MURALIDHAR, R.V. *et al.* Resolution of (RS)-proglumide using lipase from *Candida cylindracea*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 1471-1475, 2002.

NAUMANN, D. **Infrared Spectroscopy in Microbiology. In: Encyclopedia of Analytical Chemistry**, Meyers, R.A. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 102-131, 2000.

NEUGNOT, V. *et al.* The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. **European Journal of Biochemistry**, London, v. 269, p. 1734-1745, 2002.

NGO-THI, N.A. Characterization and identification of microorganisms by FT-IR microspectrometry. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 661-662, p. 371–380, 2003.

NIE, K. *et al.* Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 43, p. 142–147, 2006.

NOUREDDINI, H. *et al.* Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, p. 769-777, 2005.

OTTOSON, J. *et al.* Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1594, p. 325-334, 2002.

ORSINI, F. *et al.* FT-IR microspectroscopy for microbiological studies. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 42, p. 17–27, 2000.

PALOMO, J.M. *et al.* General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, Columbus, v. 4(1), p. 1-6, 2003.

PANZAVOLTA, F. *et al.* Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 32, p. 67–76, 2005.

PASSICOS, E. *et al.* Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26(13), p. 1073-1076, 2004.

PAVIA, Donald L. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry**. 2.ed. Washington: Western Washington University, 511p, 1996.

PEREIRA, E.B. *et al.* Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase immobilized into chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.98-100, p. 977-986, 2002.

PIZARRO, A V. L. & PARK, E. Y. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oil contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 38, p. 1077-1082, 2003.

PLOU, F.J. *et al.* Analysis of tween 80 as an esterase / lipase substrate for lipolytic activity assay. **Biotechnology Techniques**, Netherlands, v. 12, p. 183-186, 1998.

QIAN, Z. & LUTZ, S. Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 13466-13467, 2005.

QUYEN, D. T. *et al.* High-Level Formation of Active *Pseudomonas cepacia* Lipase after Heterologous Expression of the Encoding Gene and Its Modified Chaperone in *Escherichia coli* and Rapid In Vitro Refolding. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 2, p. 787–794, 1998.

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

RAJOKA, M.I. *et al.* Kinetics of batch single-cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97(15), p. 1934-1941, 2006.

RASHID, N. *et al.* Low-Temperature Lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. Strain KB700A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67. n. 9, p.4064-4069, 2001.

REETZ, M.T. *et al.* Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and Bioengineering**, Indianapolis, v. 49, p.527–34, 1996.

ROMERO, M.D. *et al.* Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 42–48, 2005.

SAXENA, R.K. *et al.* Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 239- 247, 2003.

SCHALLER, M. *et al.* Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, Berlin, v. 48(6), p. 365-377, 2005.

SECUNDO, F. *et al.* Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, Indianapolis, v. 86, p. 236-240, 2004.

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

SHIMADA, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. [Journal of Fermentation and Bioengineering, Amsterdam, v. 5](#), p. 349-352, 1993.

SHIMADA, Y. *et al.* Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Lipids**, Champaign, v.38, p. 1281-1286, 2003.

SIDDIQUI, K.S. & CAVICCHIOLI, R. Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides. **Extremophiles**, Japan, v.9, p. 471-476, 2005.

SILVERSTEIN, R. *et al.* **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 387p, 1994.

SOMMER, P. *et al.* Genetic and Biochemical Characterization of a New Extracellular Lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 9, p. 3553-3560, 1997.

SONG, H.T. *et al.* Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS 2.1216. **Protein Expression and Purification**, Amsterdam, v. 47(2), p. 393-397, 2006.

SRIVASTAVA, A. *et al.* *Candida rugosa* lipase LIP1-catalysed transesterification to produce human milk fat substitute. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Columbus, v. 54, p. 5175-5281, 2006.

SUEN, W.C. *et al.* Improved activity and thermostability of *Candida antarctica* lipase B by DNA family shuffling. **Protein Engineering Design and Selection**, Oxford, v. 17, p. 133-140, 2004.

TEJO, B.A. *et al.* Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvents. **Journal of Molecular Model**, Berlin, v. 10, p. 358-366, 2004.

TENKANEN, M. *et al.* Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 60, p. 120-127, 2002.

TING, W.J. *et al.* Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 42, p. 32-38, 2006.

TRUBIANO G. *et al.* Ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase in a solvent-free system. Role of hydrophobic interactions. **Biomacromolecules**, Columbus, v. 5, p. 1832-1840, 2004.

TSAI, S.W. *et al.* Implication of substrate-assisted catalysis on improving lipase activity or enantioselectivity in organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1764, p. 1424-1428, 2006.

TSENKOVA, R. *et al.* Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool, **Journal of Animal Science**, v.79, p. 2550–2557, 2001.

VALLIKIVI, I. *et al.* Lipase action on some non-triglyceride substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, p. 279–298, 2003.

VECCHIA, R. D. *et al.* Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 27, p. 623-630, 2004.

WACHÉ, Y. *et al.* Yeast as an efficient biocatalyst for the production of lipid-derived flavours and fragrances. [Antonie van Leeuwenhoek](#), Amsterdam, v. 89, p. 405-416, 2006.

WATANABE, Y. *et al.* Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic**, Amsterdam, v. 17, p. 151-155, 2002.

WENNING, M. *et al.* Fourier-Transform Infrared Microspectroscopy, a Novel and Rapid Tool for Identification of Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p. 4717-4721, 2002.

WON, K. *et al.* Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 2149–2154, 2005.

XIN, J.Y. *et al.* Fine separation and characterization of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 42, p. 355-363, 2002.

XU, H. *et al.* Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on methyl acrylate–divinyl benzene copolymer and its derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 17, p. 194–199, 1995.

YESILOGLU, Y. Utilization of bentonite as a support material for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 40, p. 2155–2159, 2005.

YU, H. W. *et al.* Effect of salts on activity, stability and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in isooctane. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 35, p. 28–32, 2005.

ZHAO, H. *et al.* The rapid differentiation of *Streptomyces* isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 40, p. 213–218, 2006.

## **7. VITA**

### **7.1 DADOS PESSOAIS**

Nome: Luiza Lux Lock

Nascimento: 09/01/1982, Manaus/ AM - Brasil

Filiação: Paulo Roberto Ferrer Lock e Beatriz Lux

Endereço residencial: Rua Borges de Medeiros, 27 – Ap. 302 Bairro Centro

Santa Cruz do Sul, RS - Brasil – CEP: 96810-130

Telefone: (51) 37112669/ (51) 98476930

E-mail: u2lux@hotmail.com

### **7.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO**

2005-2007 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2000-2004 - Graduação em Química Industrial.

Universidade de Santa Cruz do Sul, UNISC, RS, Brasil.

1997-1999 - Ensino Médio (2º grau).

Colégio Mauá, Santa Cruz do Sul/ RS, Brasil.

Escola Educar-se, Santa Cruz do Sul/ RS, Brasil.

1989-199 - Ensino Fundamental (1º grau).

Colégio Mauá, Santa Cruz do Sul/ RS, Brasil.