



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DO USO DE GLICEROL RESIDUAL E CARREADORES DE OXIGÊNIO  
SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Staphylococcus warneri* EX17**

Fernanda Roberta Rech

Porto Alegre

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DO USO DE GLICEROL RESIDUAL E CARREADORES DE OXIGÊNIO  
SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES DE *Staphylococcus warneri* EX17**

Fernanda Roberta Rech  
Engenheira Bioquímica – UFRGS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: PhD. Marco Antônio Záchia Ayub  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Giandra Volpato

Porto Alegre

2010

## CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

R623e Rech, Fernanda Roberta

Efeito do uso de glicerol residual e carreadores de oxigênio sobre a produção de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17./ Fernanda Roberta Rech. – Porto Alegre, 2011.

67f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós- Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Coorientadora: Giandra Volpato

### Bibliografia

1. Polidimetilsiloxanos 2. *Staphylococcus warneri* EX17 3. Lipases 4. coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ ). I. Ayub, Marco Antônio Záchia, (Orient.). II. Volpato, Giandra (Coorient.). III. Título.

CDU: 664:577.15

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

Fernanda Roberta Rech  
Engenheira Bioquímica - UERGS

## **DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

### **MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 17/12/2010  
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:  
Por:

Marco Antônio Záchia Ayub  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Giandra Volpato  
Co-orientador – Escola Técnica UFRGS

Vitor Manfrói  
Banca – UFRGS

Helen Treichel  
Banca – URI

Cleide Mara Faria Soares  
Banca – Universidade Tiradentes

José Maria Wiest  
Coordenador do Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos (PPGCTA)

Vitor Manfrói  
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos. ICTA/UFRGS

## AGRADECIMENTOS

À Capes pelo auxílio financeiro. Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub, por toda dedicação e atenção despendidas à realização do presente trabalho, mas principalmente, pela paciência com que me orientou ao longo desses dois anos. Muito obrigada por todo o aprendizado.

À Dr<sup>a</sup>. Giandra Volpato pela orientação e amizade. Pela disposição, dedicação e rapidez que sempre demonstrou no atendimento de minhas necessidades. Pelas conversas e conselhos que tornaram essa etapa mais suave e agradável.

Ao professor Plinho Francisco Hertz por permitir o uso de seu laboratório e estar sempre pronto para o esclarecimento de dúvidas.

À Dr<sup>a</sup>. Patrícia Silva Ritschel pesquisadora da Embrapa uva e vinho por despertar em mim o interesse pela pesquisa no período da graduação.

Aos colegas do Bioteclab: Nicole Sehnem, Ana Cassales, Daniele Misturini, Elis Aquino, Débora Faccin, Fernanda Pereira, Priscila de Souza- Cruz, Lilian Hickert, João Sacchetto, Suse Botelho pela colaboração sempre pronta de todos. Pelos momentos de descontração proporcionados, os quais tornavam resultados péssimos motivos de riso. Pelo coleguismo sem o qual, com certeza, não realizaríamos os nossos trabalhos. Em especial a amiga Sabrina Gabardo, pelos longos períodos passados juntos no ICTA, principalmente nos finais de semana. Pelas colaborações psicológicas e concretas. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e amizade que contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao meu bolsista Guilherme Flores pela disponibilidade, pelo companheirismo, amizade e, principalmente, pela paciência nos dias que fazíamos cultivo em Biorreatores. A todos os bolsistas de iniciação científica do Bioteclab pelos momentos de descontração.

Ao Carlos Adriano, meu namorado, para qual me faltam palavras de agradecimento. Pela paciência, dedicação e companheirismo. Por ter compartilhado comigo meus anseios e angústias. Por me acompanhar nos finais de semana no ICTA. Agora divido contigo essa vitória, afinal ela também é tua.

Aos meus irmãos Vanessa e Marcelo por acreditarem e dividirem comigo esse sonho.

Aos meus amados pais... Toda minha admiração e carinho não são suficientes para agradecer tudo o que fizeram por mim. Esse é o resultado do trabalho de vocês. Agradeço a minha mãe por toda a paciência e audiência de meus pesares e reclamações, pelo apoio e

incentivo, acreditando nesse trabalho, muitas vezes, mais do que eu mesma. A meu pai pelo exemplo de garra e dedicação.

A todos os amigos e familiares que contribuíram para a concretização desse sonho.  
Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>INDICE DE TABELAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>.1</b>
<b>1. Capítulo I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
1.1. Lipases.....	3
1.2. Microrganismos produtores de lipases .....	5
1.3. Cultivo Submerso .....	6
1.4. Condições de cultivo para a produção de lipases .....	7
1.5. Utilização de glicerol residual como substrato .....	8
1.6. Carreadores de Oxigênio.....	11
1.7. Aplicações das Lipases.....	13
1.8. Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em bioprocessos .....	15
<b>2. Capítulo II: RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>17</b>
2.1. Resultados I – Optimization of lipase production by <i>Staphylococcus warneri</i> EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers .....	17
2.2. Resultados II – Effect of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_L a$ ) and lipase production by <i>Staphylococcus warneri</i> EX17 .....	37
<b>3.DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>55</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>60</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1- Reação seqüencial de atuação de lipase sobre triacilglicerol.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2- Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas .....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3- Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 4- Fórmula estrutural do silicone .....</b>	<b>13</b>
<b>Resultados I</b>	
<b>Fig 1. Contour plots of <math>k_{La}</math> determination. The numbers inside the contour lines indicate <math>k_{La}</math> values in <math>h^{-1}</math> .....</b>	<b>28</b>
<b>Fig 2. Level curve described by the model <math>Y_2</math> which represents lipolytic activity (U/L)..</b>	<b>30</b>
<b>Fig 3: The time course of lipase production by <i>S. warneri</i> EX17 cultivated under optimized culture conditions. (■) Dry cell weight, (●) lipolytic activity, (▲) glycerol concentration.....</b>	<b>31</b>
<b>Resultados II</b>	
<b>Figure 1. Contour plots of <math>k_{La}</math> determination. The numbers inside the contour lines indicate <math>k_{La}</math> values in <math>h^{-1}</math> .....</b>	<b>46</b>
<b>Figure 2. Contour plots of determination lipolytic activity. The numbers inside the contour lines indicate the volumetric lipolytic activity. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figure 3. The time course of lipase production by <i>S. warneri</i> EX17 cultivated under optimized culture conditions. (■) biomass, (▲) glycerol concentration, (●) lipolytic activity. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figure 4. The relationship between lipolytic activity and <math>k_{La}</math>.....</b>	<b>50</b>



## INDICE DE TABELAS

### Resultados I

**Table 1. Process variables and their levels used in CCD of  $k_La$  study. ....24**

**Table 2. Process variables and their levels used in CCD of activity lipase study. ....25**

### Resultados II

**Table 1. Process Experimental design for  $k_La$  values and lipase production .....43**

## RESUMO

A transferência de oxigênio é um fator limitante para grande parte dos cultivos em biorreatores que operam com organismos estritamente aeróbios devido à baixa solubilidade do oxigênio em meios de cultivo. A introdução de meios não convencionais, como polidimetilsiloxanos (PDMS), em biorreatores pode ser vista como uma melhoria para o ajuste desses processos. Este trabalho propõe uma investigação do emprego de polidimetilsiloxano fluido e emulsificado, usados como carreadores de oxigênio, em meios de cultivo na produção de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17, cepa capaz de utilizar glicerol residual como substrato, visando melhorar a disponibilidade de oxigênio e aperfeiçoar a produtividade. Inicialmente, foram realizados estudos para selecionar o uso de glicerol residual, oriundo da síntese química de biodiesel como fonte de carbono. A atividade lipolítica foi semelhante com glicerol comercial e residual. Após a seleção do glicerol foram realizados experimentos em incubadora rotatória horizontal nas condições previamente otimizadas em trabalhos anteriores do grupo, adicionando PDMS. Dois tipos de PDMS foram testados, fluido e emulsificado. A produção de lipase foi significativamente maior no meio contendo PDMS. Assim, ferramentas de planejamento experimental, delineamento composto central (DCC) foram utilizadas para verificar a influencia do PDMS no coeficiente de transferência de oxigênio  $k_{La}$  em meio de cultivo produtor de lipase livre de células. O  $k_{La}$  aumentou significativamente no meio de cultivo contendo PDMS. Dois novos planejamentos foram desenhados, para otimizar a produção de lipase em meio de cultivo com células. Um para PDMS fluido e outro para PDMS emulsificado. No meio contendo PDMS fluido, a atividade lipolítica foi cinco vezes maior, enquanto que no meio contendo silicone emulsificado a atividade lipolítica foi três vezes maior. Este estudo demonstrou que a lipase de *S. warneri* EX17 pode ser produzida utilizando glicerol residual como fonte de carbono, e polidimetilsiloxanos como carreadores de oxigênio aumentando a transferência de oxigênio no meio e elevando a produção da enzima, que apresenta diversas possibilidades de aplicação, principalmente na indústria de alimentos.

Palavras- chaves: Polidimetilsiloxanos, *Staphylococcus warneri* EX17, lipases, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ).

## ABSTRACT

The oxygen transfer is a limiting factor in many bioreactors cultivations, in which strictly aerobic organisms are grown due to the low solubility of oxygen in culture media. The introduction of unconventional media, such as polydimethylsiloxanes (PDMS) in bioreactors can be seen as a potential improvement for these processes. This work proposes an investigation of the use of polydimethylsiloxane in its two forms, fluid and emulsified, used as carriers of oxygen in culture media for the lipase production of *Staphylococcus warneri* EX17, strain capable of using glycerol as substrate, to improve the oxygen availability and improve enzyme productivity. Initially, studies were performed to select the use of residual glycerol, derived from the chemical synthesis of biodiesel as a source of carbon. The lipase activity was similar in both commercial and residual glycerol. Experiments were performed on orbital shaker, using conditions previously optimized in another work of the group, but with the addition of PDMS. Two types of PDMS were tested, the fluid and the emulsified. The lipase production was significantly higher in medium containing PDMS. Experimental design and central composite design (CCD) were used to evaluate the influence of PDMS on the oxygen transfer coefficient  $k_{La}$  in culture medium free of lipase-producing cells. The  $k_{La}$  increased significantly in the medium containing PDMS. Two new experimental plannings were designed to optimize the production of lipase in culture medium with cells. In the medium containing the PDMS fluid lipase activity was five times higher than medium without the oxygen carrier, while in the medium containing the emulsified silicone lipase activity was three times higher. This study showed that the lipase from *S. warneri* EX17 can be produced using residual glycerol as carbon source and that polydimethylsiloxanes works as interesting carrier of oxygen by increasing oxygen transfer rates, improving enzyme production, which has several possible applications, especially in the food industry.

Key words: Polidimetilsiloxanes, *Staphylococcus warneri* EX17, lipases, oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ).

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o crescimento econômico e populacional tem estimulado o desenvolvimento de ferramentas para solucionar o grande problema da geração de resíduos. Neste contexto, surge à biotecnologia industrial uma área de grande importância que integra uma visão multidisciplinar das áreas de microbiologia, bioquímica e engenharia química e tem sido a base para o desenvolvimento e otimização de processos a partir de subprodutos.

O aumento dos problemas ambientais, gerados pelo crescimento econômico e populacional tem influenciado o desenvolvimento de fontes de energia sustentáveis, novos métodos de diagnosticar e resolver questões ambientais desenvolvendo processos menos prejudiciais ao ambiente do que os anteriormente utilizados. Nesse sentido, o biodiesel aparece como uma possibilidade promissora para o desenvolvimento de tecnologias limpas.

Na síntese de biodiesel, o glicerol é o principal subproduto gerado, correspondendo a 10% do volume total de biodiesel produzido. A produção deste biocombustível está significativamente acelerada, portanto para evitar problemas futuros de acumulação de glicerol e tornar a produção de biodiesel mais competitiva é necessária a busca de alternativas para aplicação do glicerol residual, visto que, em sua forma pura ele possui diversas aplicações.

Uma alternativa é a conversão microbiana do glicerol por processos biotecnológicos em produtos de maior valor agregado como as enzimas. A maior fatia do mercado industrial de enzimas é ocupada pelas hidrolíticas e, dentro destas as lipases, principalmente as obtidas por microrganismos.

Esses biocatalisadores são aplicados em diversos setores industriais e, seu emprego tem aumentado nos últimos anos. No entanto o seu alto custo de produção restringe a sua utilização nos diferentes setores industriais. A utilização do subproduto glicerol como substrato para a produção de lipases, além de agregar valor a materiais de baixo custo no mercado, pode reduzir o preço final da enzima.

A produção de lipases microbianas é afetada por diversos fatores como: temperatura, pH, composição do meio e outros. Um dos parâmetros mais importante é a transferência de oxigênio no meio de cultivo. A baixa solubilidade do oxigênio em meios aquosos torna necessário o seu constante fornecimento, em quantidade suficiente para suprir a demanda dos microrganismos, principalmente em cultivos em biorreatores. A limitação de oxigênio dissolvido no meio de cultura é um grande problema enfrentado no desenvolvimento de

processos aeróbios, pois quase sempre resulta em um crescimento celular lento e baixo rendimento dos produtos.

Nesse sentido muitos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de melhorar a transferência de oxigênio em meios de cultivo, alguns envolvendo a melhoria do desenho de biorreatores, e outros envolvendo a utilização de carreadores de oxigênio para aumentar a solubilidade do gás. Os carreadores de oxigênio mais utilizados são os perfluorocarbonos (PFCs), usados com uma segunda fase líquida em biorreatores aerados.

A presença de uma fase orgânica, como o PFC, permite que o oxigênio seja transferido através de um complexo jogo de transferência entre a fase líquida e a fase gasosa, o que promoverá ou condicionará o acesso do oxigênio às células. Apesar dos PFCs serem biologicamente inertes e não tóxicos eles são extremamente caros, o que aumenta o custo do processo.

Uma alternativa para o uso de PFCs são os polidimetilsiloxanos (silicones), que possuem as mesmas características com a vantagem de ser extremamente mais barato, permitindo o desenvolvimento de um processo eficaz e de baixo custo.

Com o intuito de aumentar a transferência de oxigênio em cultivos submersos e aproveitar um resíduo industrial para a obtenção de um bioproduto, **o objetivo principal** deste trabalho foi estudar a adição de polidimetilsiloxano na produção de lipase por *Staphylococcus warneri* usando glicerol residual como substrato em sistema batelada.

Os **objetivos específicos** foram:

- Estudar o potencial de polidimetilsiloxano (silicone) como carreador de oxigênio em sistema batelada.
- Estudar a influência da adição de polidimetilsiloxano (silicone) no meio de cultivo em relação à transferência de oxigênio, produção de biomassa e produção da enzima.
- Estudar a viabilidade da produção de lipases por *Staphylococcus warneri* EX17 usando como fonte de carbono glicerol residual com baixo grau de pureza.

Esta dissertação foi desenvolvida, nos laboratórios de Enzimologia, Biotecnologia I e II, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

## Capítulo I: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) representam um grupo de enzimas com elevada aplicabilidade em biotecnologia (HORSHANI *et al.*, 2009). Elas constituem uma família de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, levando através de uma reação seqüencial, a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (ERICSSON *et al.*, 2008; HILAL *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2005; JAHIC *et al.*, 2003; REETZ, 2002; SHARMA *et al.*, 2001). A Figura 1 mostra como ocorre esta reação, sendo que as lipases atuam sobre a ligação éster, sendo os alcilgliceróis seus melhores substratos (REETZ, 2002). Em meio aquoso as lipases podem ser usadas para hidrolizar reações, e em solventes orgânicos podem ser usadas para síntese de ésteres (JAHIC *et al.*, 2003).

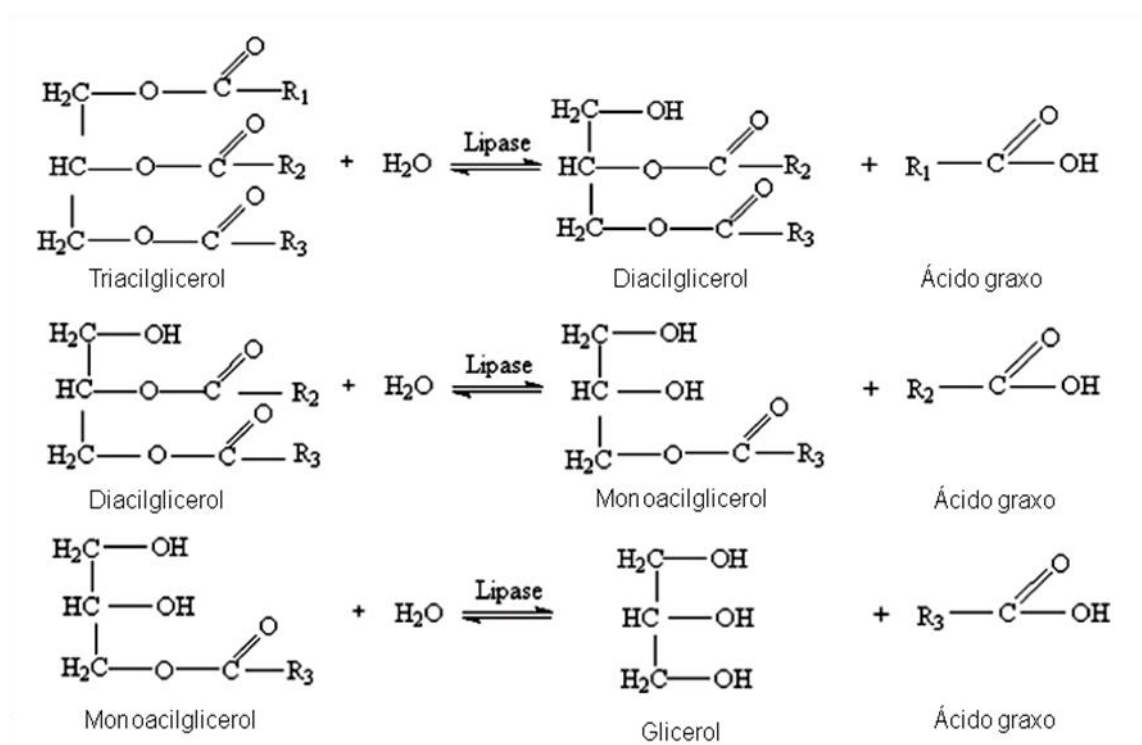


Figura 1- Reação sequencial de atuação de lipase sobre triacilglicerol (DEREWENDA, 1994)

A maior fatia do mercado industrial de enzimas é ocupada por proteases, amilases, amidases, esterases e lipases (BEREKAA *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2004a).

As lipases atuam sobre ácidos graxos de cadeia longa, com mais de dez átomos de carbono, elas preferem substratos insolúveis em água, ao contrário das esterases que preferem ácidos graxos de cadeia curta e atuam sobre substratos solúveis em água (LIMA *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2004a; SHARMA *et al.*, 2001).

As lipases atuam preferencialmente em interfaces orgânico-aquosas, e a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, sendo que, as lipases preferem substratos emulsionados (JAEGER e REETZ, 1998; VERGER *et al.*, 1997).

O fenômeno de ativação interfacial está relacionado com a estrutura tridimensional da enzima e o seu mecanismo de ação (Figura 2). As lipases contêm um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou borda, que cobre a entrada do sítio ativo, quando o substrato liga-se à superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

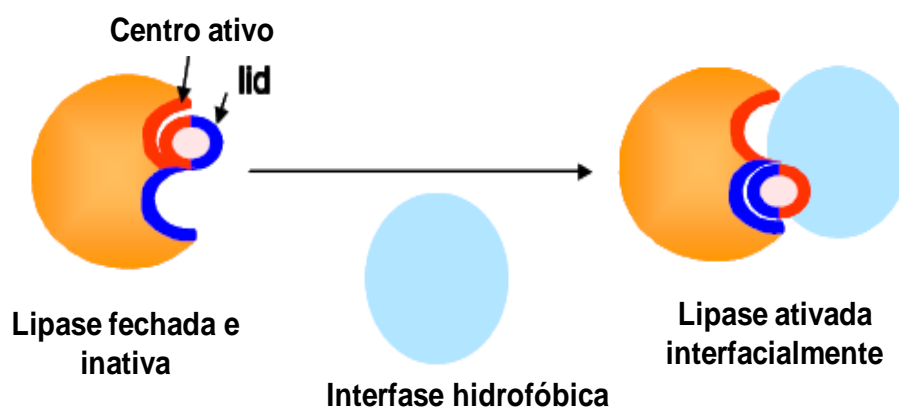


Figura 2- Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas (VOLPATO, 2009).

A temperatura e pH ótimo de atuação das lipases varia de acordo com a fonte de origem da enzima (HORSHANI *et al.*, 2009; van KAMPEM *et al.*, 2001). Geralmente as lipases produzidas por microrganismos são mais estáveis (CASTRO, 2004) e encontram grande aplicabilidade em indústrias de alimentos, detergentes, tratamentos de efluentes entre outras (HORSHANI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2005; JAHIC *et al.*, 2003; van KAMPEM *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2001).

Com o auxílio da biotecnologia muitos estudos estão sendo realizados com lipases devido aos seus aspectos biológicos e fisiológicos relacionados à produção e aplicação industrial, principalmente no setor alimentício (RAJENDRAN *et al.*, 2009; FICKERS *et al.*, 2008; JOSEPH *et al.*, 2008; JAEGER e REETZ, 1998).

## 1.2. Microrganismos produtores de lipases

As lipases são amplamente encontradas na natureza. Elas podem ser produzidas por fontes animais, vegetais ou microbianas (HORSHANI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2001). As lipases produzidas por microrganismos são mais interessantes para o setor industrial, devido as suas propriedades enzimáticas, como especificidade, estabilidade, temperatura e pH de atuação, alta velocidade de síntese de reações e alto rendimento de conversão do substrato em produto (JAEGER e EGGERT, 2002).

Um estudo realizado por Sharma *et al.* (2001), listou 109 diferentes espécies de microrganismos produtores de lipases, destes 47 foram obtidas por bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus* (15) e *Pseudomonas* (12), 42 foram obtidas por fungos e 20 por leveduras. Entre as leveduras produtoras de lipases destacam-se: *Yarrowia lipolytica* (AMARAL *et al.*, 2007; FICKERS *et al.*, 2005), *Candida Antarctica* (ERICSSON *et al.*, 2008) *Candida rugosa* (DE MARÍA *et al.*, 2006). Os fungos mais citados na literatura como produtores de lipases são os gêneros *Aspergillus* (MAHADICK *et al.*, 2002), *Rhizopus* (PASTORE *et al.*, 2003; UL-HAQ *et al.*, 2002); *Penicillium* (SAXENA *et al.*, 2003) entre outros. Quanto às bactérias, vários autores reportam a produção de lipases por *Staphylococcus*.

Estas enzimas têm sido estudadas quanto a sua produção, purificação, caracterização bioquímica e molecular, e aplicação, entre elas se destacam: *S. xylosus* (MOSBAH *et al.*, 2005; MOSBAH *et al.*, 2007); *S. saprophyticus* (FANG *et al.*, 2006); *S. aureus* (HYUK *et al.*, 2002; HORCHANI *et al.*, 2009); *S. haemolyticus* (OH *et al.*, 1999); *S. carnosus* (VOIT *et al.*, 1991); *S. epidemidis* (SIMONS *et al.*, 1998; JOSEPH *et al.*, 2006); *S. warneri* (TALON *et al.*, 1995; TALON *et al.*, 1996; van KAMPEN *et al.*, 2001).

As lipases de origem microbiana são muito importantes para a biotecnologia, pois além de apresentarem grande eficiência nos processos de produção podem ser obtidas a um custo inferior quando comparada a lipases de outras fontes (GUPTA *et al.*, 2007; HASAN *et al.*, 2006; BURKERT *et al.*, 2004). Além disso, a produção de lipases por microrganismos



possibilita a criação de novos sistemas enzimáticos, o que não é possível obter em fontes animais e vegetais (JESUS *et al.*, 1999).

É interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos biotecnológicos pelo emprego de novos microrganismos, melhores produtores, e pela otimização dos meios de cultivo. Como a matéria- prima contribui significativamente para o custo total da produção, a redução das quantidades desta e o emprego de materiais mais baratos, pode ser uma estratégia adequada para aumentar a produtividade do processo (DOMINGUEZ *et al.*, 2003).

### 1.3. Cultivo Submerso

Atualmente a estratégia de cultivo melhor definida para a produção de lipases é a de cultivo submerso (YANG *et al.*, 2007). Os cultivos submersos são definidos como aqueles em que a célula produtora se desenvolve no interior do meio de cultivo, sob agitação. Os cultivos submersos podem ser realizados em frascos agitados (erlenmeyers), em incubadora rotatória, onde os controles de pH e transferência de oxigênio são difíceis; ou em biorreatores que permitem o controle de vários parâmetros (ALONSO, *et al.*, 2001).

Os cultivos submersos podem ser operados de forma contínua, semicontínua ou descontínua. Os processos descontínuos podem ser realizados na forma batelada, na qual uma suspensão celular é adicionada ao meio de cultivo e o processo transcorre sem adição ou retirada do meio de cultivo reacional. Já o cultivo em batelada alimentada consiste em realimentar o processo durante sua execução de forma intermitente ou contínua, sem que ocorra a retirada de material durante a operação (ALONSO, *et al.*, 2001).

A escolha do sistema de cultivo e o modelo do biorreator são um fator chave para a produção de lipases (GALACTION *et al.*, 2004). O parâmetro mais importante no cultivo em biorreator é a transferência de oxigênio, que pode ser descrita e analisada através de medidas do coeficiente volumétrico de transferência de massa,  $k_{La}$  (GALACTION *et al.*, 2004). Vários fatores afetam os valores de  $k_{La}$ , entre eles, a composição do meio de cultivo, concentração e morfologia do microrganismo, características geométricas e operacionais dos biorreatores (CHISTI & JAUREGUI- HAZA, 2002).

Como observado na literatura, os processos descontínuos são os mais utilizados na produção de enzimas extracelulares. Li *et al.*, (2005) utilizaram a bactéria *Acinotobacter radioresistens* para produzir lipases usando o sistema de cultivo batelada alimentada.

Montesinos *et al.* (2003) utilizaram *Candida rugosa* em sistema batelada e batelada alimentada para produção de lipases. Os autores concluíram que o uso de cultivo batelada alimentada aumentou em 50% a produtividade da enzima em comparação com cultivo em batelada.

Portanto, o sucesso de um cultivo submerso dependerá do produto que se procura obter, bem como da escolha da forma de operação.

#### **1.4. Condições de cultivo para a produção de lipases**

A produção de lipases microbianas pode ser afetada por vários fatores, entre eles, composição do meio de cultivo, incluindo tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH e temperatura da cultura, concentração de oxigênio e muitos outros fatores relacionados com a forma do biorreator (KUMAR *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2004a; JAEGER e EGGERT, 2002; SHARMA *et al.*, 2001).

O fator nutricional de maior importância na produção de lipases é a fonte de carbono, pois são enzimas induzíveis, sendo geralmente produzidas na presença de fontes lipídicas, como óleos, triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais biliares e glicerol (GUPTA *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2001).

Alguns ácidos graxos de cadeia longa como o oléico, linoléico e linolênico são usados para induzir a produção de lipases de bactérias, tal como *Pseudomonas mephitica* (GHOSH *et al.*, 1996) e *Enterobacter aerogenes* (KUMARI *et al.*, 2009). A fonte de nitrogênio também influencia a produção de lipases. Geralmente, utiliza-se nitrogênio orgânico, tais como peptona e extrato de levedura. Esses nutrientes têm sido usados como fonte de nitrogênio para a produção de lipases de várias linhagens de *Bacillus* spp e *Pseudomonas* (GUPTA *et al.*, 2004a).

Estudos têm sido realizados para definir as condições ótimas de cultivo e necessidades nutricionais para produção de lipases, com a finalidade de aumentar o rendimento da enzima. Montesinos *et al* (2003) estudaram a produção de lipases intra e extracelulares, produzidas pela levedura *Candida rugosa*, em cultivo submerso, em sistemas batelada e batelada-alimentada. Eles investigaram o uso de uma única fonte de carbono no sistema de cultivo e o uso de diferentes misturas de fonte de carbono. Neste trabalho os autores concluíram que o

melhor rendimento da lipase foi obtido usando uma única fonte de carbono (ácido oléico) em cultivo batelada alimentada.

Lin *et al* (2006) investigaram a influencia de diferentes condições de cultura (pH e temperatura) e fatores nutricionais (fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas) sobre a produção de lipases por *Antrodia cinnamomea* em cultivos submersos. Eles observaram que as condições ótimas para a produção das lipases foram em pH de 5,5; temperatura de 25°C sob agitação. Os fatores nutricionais foram otimizados em 50 g/L de glicerol, 5 g/L de nitrato de sódio, 1 g/L de tiamina. Neste estudo os autores concluíram que o controle das condições de cultivo e as modificações da composição do meio podem aumentar drasticamente a produção de lipases por *Antrodia cinnamomea*.

Em outro estudo Maia *et al* (2001) investigaram o efeito das condições de cultivo na produção de lipases por *Fusarium solani* em sistemas de cultivo batelada. Eles observaram os efeitos de diferentes fontes de carbono e suplementação de elementos traços adicionados ao meio basal. Nesse estudo os autores concluíram que a produção e atividade da enzima aumentaram quando o meio basal foi suplementado com óleo de oliva, óleo de milho e óleo de gergelim.

Outras fontes nutricionais têm sido investigadas, sendo que a fonte de carbono é o fator mais estudado na produção de lipase, principalmente o uso de óleos vegetais por se tratar de indutores desta enzima. (BURKERT *et al.*,2004; LI *et al.*,2005; GULATI *et al.*,2000; HEMACHANDER *et al.*,2001; TAN *et al.*, 2003; GORDILHO *et al.*, 1998).

Outro fator que tem influenciado a produção de lipases é a concentração de oxigênio disponível no meio de cultivo. A inadequada provisão de oxigênio é um fator crítico para cultivos aeróbios em meios submersos (AMARAL, *et al.*,2007; ELIBOL e OZER *et al.*, 2000). Estudos presentes na literatura demonstram que o aumento da transferência de oxigênio em biorreatores aumenta a produtividade da enzima (AMARAL, *et al.*,2007; GALACTION *et al.*,2004; ELIBOL e OZER, 2000; CHEN, *et al.*,1999).

### **1.5. Utilização de glicerol residual como substrato**

A produção de biodiesel encontra-se em crescimento acelerado, e como consequência, a quantidade de subproduto gerado, aproximadamente 10% do volume total de biodiesel produzido corresponde a glicerol residual. Uma alternativa para tornar a produção de

biodiesel mais rentável é a implementação de estratégias biotecnológicas que utilizem o glicerol como única fonte de carbono para obtenção de produtos de maior valor agregado.

O glicerol na sua forma pura possui diversas aplicações industriais (aditivos para a indústria de alimentos, química e farmacêutica). O glicerol obtido da transesterificação de triglicerídeos com álcool apresenta impurezas como: água, sais, ésteres, álcool e óleo residual que lhe conferem baixo custo. Como os processos para sua purificação são de custo excessivamente elevados existe um grande interesse no seu reaproveitamento direto, sem tratamento.

O glicerol é uma fonte de carbono altamente reduzida e assimilável por bactérias e leveduras sob condições aeróbias e anaeróbias para a obtenção de energia metabólica, como, regulador do potencial redox e para a reciclagem de fosfato inorgânico dentro da célula (DILLIS *et al.*, 1980). Vários estudos foram desenvolvidos visando à utilização de glicerol como fonte de carbono por microrganismos, especialmente por bactérias. Muitos deles apontam principalmente os mecanismos de assimilação de glicerol por estes microrganismos para a produção de compostos intermediários de polímeros, resinas e aditivos para combustíveis (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2007).

A assimilação do glicerol por microrganismos envolve o transporte passivo e ativo. A passagem do glicerol pela membrana celular constitui a primeira etapa para o seu metabolismo, no interior da célula o glicerol pode ser catabolizado por várias rotas metabólicas independentes, conforme apresentado na Figura 3.

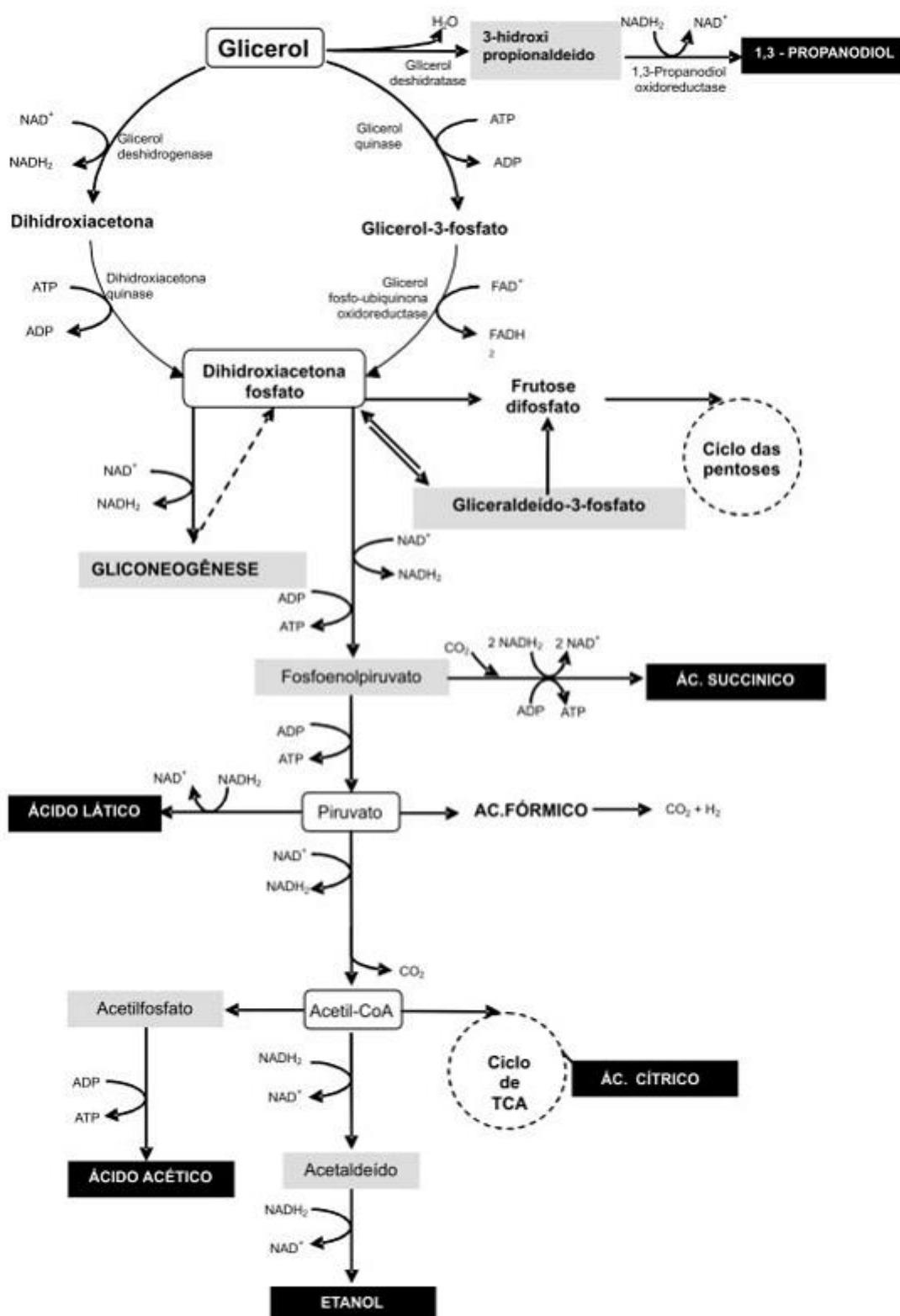


Figura 3- Vias metabólicas de assimilação de glicerol por microrganismos e seus possíveis produtos. (Adaptado de: GANCEDO, GANCEDO, 1968; HAUGE, KING, CHELDELIN, 1955; XIU *et al.*, 2007)

No item 1.4. foram citadas as diversas fontes de carbono que vem sendo utilizadas para a produção de lipases. Porém, poucos estudos têm sido realizados utilizando glicerol como substrato para produção de lipases (LIN *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2004).

O glicerol tem sido utilizado com fonte de carbono para a produção de bioprodutos em vários estudos. Wilke e Vorlop (2008) e Mu *et al.* (2006) utilizaram glicerol oriundo da síntese de biodiesel para produzir 1,3- propanodiol. ITO *et al.* (2005) estudaram a produção de hidrogênio por *Enterobacter aerogenes* HU-101, utilizando glicerol presente no efluente da síntese de biodiesel por lipase, com 41% de pureza, e demonstraram um alto rendimento e uma alta taxa de produção do bioproduto desejado. O glicerol também foi usado com sucesso na produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica* (LEVINSON *et al.*, 2007; PAPANIKOLAU *et al.*, 2002).

Em estudos recentes, Papanikolau *et al.* (2008) utilizaram glicerol residual para a produção de 1,3 propanodiol, ácido cítrico e óleos celulares simples. Rymowicz *et al.* (2009) utilizaram glicerol residual para a produção de eritrol, a partir de 300 g/L de glicerol produziram 170 g/L de eritrol, resultando num rendimento de 56%. Athalaye *et al.* (2009) usaram o fungo *Pythium irregulare* para converter glicerol em ácido eicosapentaenóico (EPA).

Embora a literatura cite diversos trabalhos utilizando glicerol puro e glicerol residual para a produção de alguns bioprodutos, poucos estudos estão sendo realizados visando a produção de enzimas utilizando glicerol como fonte de carbono para o microrganismo produtor. Souza *et al.* (2006) demonstraram que o glicerol foi a melhor fonte de carbono para formação de biomassa e produção de transglutaminase por *Bacillus circulans* BL32.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura que demonstram a utilização de glicerol para produção de lipase (VOLPATO *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2004).

## 1.6. Carreadores de Oxigênio

Carreadores de oxigênio são substâncias adicionadas ao meio de cultivo com a finalidade de aumentar a solubilidade do gás na fase líquida. Os carreadores mais utilizados são: Perfluorocarbonos, Hemoglobina, Hidrocarbonetos e Poli-dimetilxano.

Perfluorocarbonos são moléculas sintetizadas a base de petróleo, derivadas de hidrocarbonetos pela substituição dos átomos de hidrogênio por átomos de flúor. Eles possuem alta estabilidade química e térmica devido à presença de fortes ligações entre o flúor e o carbono. Além disso, tem sido provado que esses compostos são inertes biologicamente, sem toxicidade frente a sistemas biológicos (LOWE, 2002).

Uma das principais propriedades dos PFCs líquidos é que eles podem dissolver grandes volumes de oxigênio e gás carbônico. A solubilidade do oxigênio em PFC é de 10-20 vezes maior que em água pura. Esta solubilidade encontra-se relacionada com o volume molecular do gás a ser dissolvido e aumenta linearmente com a pressão parcial aproximando-se da lei de Henry (AMARAL *et al.*, 2007).

A capacidade de perfluorocarbonos dissolverem gases da cadeia respiratória em meios líquidos tem atraído o interesse de biotecnólogos, eles têm estudado melhores formas de aplicar os PFCs em meios de cultura para aumentar o rendimento das fermentações. Alguns trabalhos encontrados na literatura mostram o sucesso do uso de PFC no aumento da transferência de oxigênio em biorreatores e conseqüente aumento da produtividade.

Amaral *et al* (2007) investigaram o efeito de PFC's sobre a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. Os autores observaram que PFCs adicionados ao meio aumentaram a produtividade da enzima em até 23 vezes quando utilizado no meio de cultivo 20 % de PFC em relação ao controle sem PFC.

Elibol e Ozer (2000) estudaram a adição de 10% de perfluorodecalin, um tipo de perfluorocarboneto, em meio de cultivo para a produção de lipase pelo fungo *Rhizopus arrhizus*, e observaram um aumento na produção de lipase e biomassa.

Perfluorocarbonos têm sido estudados em sistemas bacterianos (DAMIANO e WANG, 1985), em cultivos de fungos filamentosos (ELIBOL e MAVITUNA, 1995; ELIBOL e MAVITUNA, 1996), e de leveduras (JUNKER *et al.*, 1990; ELIBOL, 1997) para promover uma melhora na transferência de oxigênio sob condições de fermentação.

Polidimetilsiloxanos mais conhecidos como silicone são polímeros, formado por um núcleo inorgânico silício- oxigênio com grupos laterais orgânicos ligados aos átomos de silício (Figura 4).

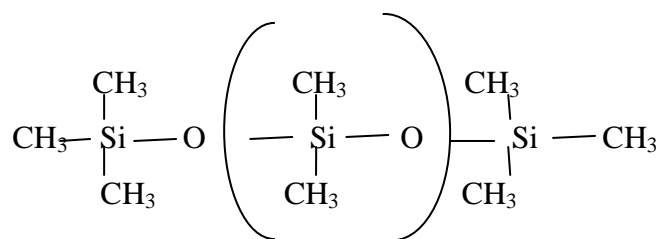


Figura 4- Fórmula estrutural do silicone

Silicones são compostos quimicamente inertes, insípidos, inodoros e incolores, resistentes a calor, água ou agentes oxidantes. Eles têm sido usados como carreadores de oxigênio para aumentar a solubilidade desse gás em sistemas biológicos (DEY *et al.*, 2004).

Na literatura poucos trabalhos relatam o uso de silicone como carreadores de oxigênio (DEY *et al.*, 2004; ATES *et al.* 2006), portanto existe a necessidade de estudos com diferentes silicones, pois quando comparados aos perfluorocarbonos os silicones agregam a vantagem de terem um menor custo.

### 1.7. Aplicações das Lipases

As lipases microbianas são mais interessantes para aplicações industriais quando comparadas as lipases de origem vegetal e animal. O interesse por lipases produzidas por microrganismos é justificado pelas seguintes características: estabilidade, alta conversão de substrato em produto, facilidade de manipulação genética, rápido crescimento do microrganismo, utilização de meios de cultivos baratos, por apresentarem uma ampla faixa de atuação de temperatura e pH, e finalmente por produzirem lipases extracelulares de fácil obtenção (HORSHANI *et al.*, 2009; KUMA *et al.*, 2005 SHARMA *et al.*, 2001).

Devido às características mencionadas as lipases são consideradas o grupo mais importante de biocatalisadores com diversas aplicações biotecnológicas como no processamento de óleos e gorduras, formulação de detergentes, processamento de alimentos, nos processos de síntese usados em química fina e farmacêutica, manufatura de papel, produção de cosméticos e perfumes, síntese de biodiesel e tratamento de efluentes entre outros (SHARMA *et al.*, 2001).

No setor alimentício as lipases têm sido utilizadas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos e, que podem conferir um peculiar sabor e aroma aos alimentos, muitas vezes alterando as



propriedades físico-químicas, organolépticas e nutricionais de diversos produtos (JAEGER e REETZ, 1998).

Na indústria de laticínios as lipases são utilizadas para a hidrólise de gorduras do leite, na aceleração dos processos de maturação de queijos e no desenvolvimento de aromas e sabores. Ainda na indústria de laticínios, as lipases são utilizadas para a obtenção de margarinas de baixo valor calórico (ALONSO *et al.*, 2001).

Na fabricação de pães, estas enzimas podem ser empregadas para melhorar a textura da massa. E também podem ser aplicadas na produção de ácidos graxos ômega 3 e alimentos nutracêuticos.

Na indústria farmacêutica as lipases são usadas para substituir reagentes químicos. A enantioseletividade é uma característica que a maioria dos fármacos possuem, de se encaixarem perfeitamente num sítio ativo. O uso de lipases permite a enantioseletividade de algumas reações, ou seja, elas conseguem fazer uma diferenciação entre dois compostos químicos e hidrolisar preferencialmente um deles. Além desta vantagem as lipases são mais seletivas, agem localmente, não degradam o composto como os reagentes químicos não poluem o meio ambiente e possuem um custo menor.

A indústria de cosméticos e perfumaria tem desenvolvido processos, que empregam lipases na produção de emulsificantes, aromas, surfactantes e emolientes que fazem parte da composição de cremes (SHARMA *et al.*, 2001).

A utilização de lipases no tratamento da polpa de papel tem reduzido a decomposição de resinas nos cilindros de secagem, fato este que afetava a produção e qualidade do papel. O uso de lipases torna desnecessária a limpeza freqüente dos cilindros (JAEGER E REETZ, 1998).

No tratamento de efluentes as lipases podem ser utilizadas diretamente na forma bruta ou isolada para hidrolisar sólidos em suspensão, especialmente gorduras, promovendo um pré- tratamento de efluente antes da digestão anaeróbia (ROBLES *et al.*, 2000). Elas podem ser usadas para acelerar os processos de degradação de gorduras em detritos industriais, efluentes que contém elevados teores de gordura, e apresentam elevada Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). A degradação biológica desses rejeitos é um processo lento, tendo como etapa limitante a liberação de ácidos graxos pelos microrganismos com atividade lipolítica. Assim, a adição de lipases pode auxiliar na redução do tempo de retenção hidráulica e aumentar a eficiência do processo (PEREIRA *et al.*, 2004; MENDES E CASTRO, 2005).

As lipases podem ser utilizadas como catalisadores de reações químicas na produção de biodiesel. A produção industrial de biodiesel é na maioria das vezes realizada por

metanólise de óleos vegetais, usando catalisadores químicos. Esse processo gera poluição ambiental devido a geração de resíduos e necessita de muita energia (SHIMADA *et al.*, 2002). Lipases com capacidade de catalisar reações de transesterificação em solventes orgânicos são consideradas como um importante biocatalisador para a produção de biodiesel (JAEGER e EGGERT, 2002). O método enzimático comparado ao método químico simplifica o procedimento para a recuperação de metil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e dos produtos gerados (glicerol) eliminando a geração de resíduos (YANG *et al.*, 2007).

### **1.8. Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em bioprocessos**

Nos últimos anos, a utilização de ferramentas estatísticas como o planejamento experimental e superfície de resposta têm sido amplamente usadas para a otimização de bioprocessos. O uso dessas ferramentas permite maior eficiência e economia do processo, pois reduz o número de experimentos (RODRIGUEZ e IEMMA, 2005).

O planejamento experimental pode ser definido como um conjunto de técnicas freqüentemente utilizadas em estudos de processos para a investigação qualitativa e quantitativa, explorando os efeitos de variáveis de entrada (parâmetro) e variáveis de saída (respostas). Através de um planejamento de experimento pode-se extrair o máximo de informações úteis, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação (NETO *et al.*, 1996).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais, ela foi introduzida por Box na década de cinquenta. Esta técnica permite considerar diferentes variáveis e as interações entre elas, com a possibilidade de detectar o erro experimental e otimizar mais de uma variável ao mesmo tempo (NETO *et al.*, 2001). Por isso, deve-se identificar os parâmetros que serão otimizados e as respostas que serão analisadas, formular o plano experimental, ajustar o modelo matemático e estabelecer uma solução ótima (MONTEIRO, 1984).

Este método demonstra vantagem frente aos métodos convencionais, pois além de reduzir o número de experimentos, permite analisar a interação entre as variáveis estudadas (ELIBOL, 2002).

Muitas estratégias têm sido eficientemente empregadas para aumentar a produção de enzimas por microrganismos. Entre eles, fatores que influenciam nas condições de cultivo e a otimização destes fatores para a produção de enzima é um passo importante para futura aplicação comercial e envolve o estudo de parâmetros físico-químicos como, a transferência de oxigênio e adição de polidimetilexanos no meio de cultivo.

## Capítulo II: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os artigos constituintes desse capítulo estão apresentados nos itens Resultados I e II, respectivamente, de acordo com as normas exigidas pelos periódicos aos quais serão submetidos.

### **2.1. Resultados I – Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers**

O primeiro artigo intitulado “**Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers**” consiste no estudo dos efeitos da aeração, velocidade de agitação e concentração de polidimetilsiloxano sobre o  $k_{La}$ , e no estudo dos efeitos do PDMS e  $k_{La}$  sobre a produção de lípases, através de dois planejamentos experimentais. O artigo foi aceito pelo Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

**Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers**

**Fernanda Roberta Rech<sup>1</sup>, Giandra Volpato<sup>2</sup>, and Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1\*</sup>**

**<sup>1</sup>Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Goncalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda., Av. Ipiranga, 6681, TecnoPuc, Building 92A, Partenon, ZC 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.**

**Abstract**

In this research the combined effects of polydimethylsiloxane (PDMS) and different conditions of oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ), on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 were studied and optimized in bioreactor cultures. Raw glycerol from biodiesel synthesis was used as sole carbon source. Full-factorial central composite design and the response surface methodology were employed for the experimental design and analysis of the results. The optimal polydimethylsiloxane concentration and mass coefficient transfer ( $k_{La}$ ) were found to be 13.5 % (v/v) and 181 h<sup>-1</sup>, respectively. Under these conditions, a maximal cell production obtained was 10.0 g/L, and the volumetric lipase activities of approximately 490 U/L, after 6 h of cultivation. These results are in close agreement with the model predictions. Results obtained in this work reveal the positive effects of PDMS on oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) in the *Staphylococcus warneri* EX17 cultivation and lipase production.

---

\*Corresponding author. Phone: +55 51 3308 6685; Fax +55 51 3308 7048; e-mail: mazayub@ufrgs.br

*Keywords:* Microbial lipases; *Staphylococcus warneri* EX17; oxygen mass transfer coefficient; response surface methodology; bioprocess optimization.

## 1. Introduction

The major share of the industrial enzyme market is occupied by hydrolytic enzymes such as lipases, amylases, amidases, esterases, and proteases [10]. Lipases (EC 3.1.1.3) represent an important group of biotechnologically valuable enzymes. They are widely distributed in the nature and can be obtained from animals, plants and microorganisms. Microbial lipases are the most interesting due to their potential applications in foods, dairy products, pharmaceuticals, detergents, textiles, in the synthesis of biodiesel, and for new polymeric materials [11]. They not only catalyse the hydrolysis of fats and oils, but also the synthesis of long chain acylglycerols. Microbial lipases show high substrate specificity, enantioselectivity, do not require cofactors and are stable in organic solvents [12].

The production of microbial lipases is strongly affected by several aspects of the culture, especially the pH, temperature, medium composition, aeration and agitation [2]. In particular, the mass transfer coefficient,  $k_{La}$ , has been shown to be one of the most important parameters affecting the production of this enzyme [6]. In aerobic submerged cultivations, the supply of oxygen from the gas phase must be carefully controlled in order to keep the microorganism aerobic metabolism for growth and product formation. However, the mass transfer rate of oxygen from gas phase to a liquid medium is often a rate-limiting factor in the oxidative processes [7]. Some of the new methods formulated to improve oxygen supply in aerobic microbial culture include the manipulation of microbial metabolism through genetic engineering and the use of oxygen carriers such as hydrocarbons, haemoglobin, and perfluorocarbons (PFCs) [5]. PFCs have been shown to efficiently improve oxygen supply in

several biological systems and, in microbial cultures, they have been used to improve the production of some enzymes, including lipases [6]. However, the extremely high prices and difficult to use of PFCs have hindered their use in industrial scale bioprocesses [4].

Polydimethylsiloxanes (PDMS) are copolymers of ethylene or propylene oxide, designed by Leonhard et al. [14] and their versatility and broad range of uses were soon to be incorporated by industry. PDMS are cheap, chemically stable and biologically safe, ease to handle and extensively applied to supply oxygen into enzymatic reactions [21]. It is also used as detergent in lipase kinetics studies [22, 4]. Notwithstanding these remarkable properties and the fact that oxygen solubility in PDMS copolymers is about 45-50 fold higher than in water, these chemicals have barely been tried for microbial cultivations.

One exception is the work of Leonhardt et al.[14], who have reported the use of PDMS in order to provide oxygen during  $\alpha$ -keto-acid production by immobilized bacteria. The authors reported an increase of L-amino acid oxidase activity of immobilized cells by a factor of four in the presence of silicon emulsions. In another study, Zimoeck et al.[22], studied the biological bleaching of hardwood Kraft pulp with *T. versicolor* and observed a threefold increase in the oxygen uptake rate in cultures of this fungus when PDMS was added to the medium. The PDMS also stimulated brightening of the hardwood Kraft pulp by *T. versicolor* when cells were immobilized in polyurethane foam.

The use of statistical approaches involving response surface methodology (RSM) is been widely used for the optimization of microbial culture conditions and to help understand the interactions among various parameters while using a minimal number of experiments [13]. Factorial design of a limited set of variables is advantageous in relation to the conventional method where a single parameter is individually tested that frequently fails to define optimal conditions for the process since the effects of interactions among factors are lost [9].

In a previous work we have reported the isolation of a new strain of *Staphylococcus warneri* (EX 17) for lipase production and presented some data on the production of this enzyme concerning medium composition, optimal pH and temperature [19]. In the present work we investigated the effects of oxygen supply in cultures of *S. warneri*, especially concerning the maximization of lipase production, using the CCD approach. First, it was defined the influence of agitation speed, aeration, and PDMS concentrations on oxygen volumetric mass transfer coefficients ( $k_{La}$ ) in bioreactors. Then, the combined effects of varying  $k_{La}$  and PDMS concentration on cell growth and enzyme production were investigated. Raw glycerol from biodiesel synthesis was used as the sole carbon source.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Microorganism, cultures maintenance and inoculum preparation*

A strain of *Staphylococcus* isolated by our group from an abattoir fat-rich wastewater was used in this research. This strain was identified by 16S rDNA gene sequencing and identified as *Staphylococcus warneri* strain EX17 [19]. Stocks of this bacterium are kept at Microbiology Culture Collection of BiotecLab (UFRGS, Brazil). Working stocks of cultures were maintained frozen at -18 °C in 20 % glycerol suspensions, while for immediate use, cells were kept at 4°C on tributyrin agar plate containing (in g/L): peptone, 5; yeast extract, 3; tributyrin, 10. Pre-inocula for cultivations were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 200 mL of LB medium inoculated with a loopful from the plate cultures and incubated at 37°C, 180 rpm, until cultures reached an optical density (OD, Abs at 600 nm) of 1.0 and were then transferred to the bioreactors.

### *2.2. Polydimethylsiloxane (PDMS)*



For the purposes of testing improved oxygen transfer mechanisms in the cultures, the chemical polydimethylsiloxane (PDMS; 200 Fluid, Food Grade, 350 cSt., Dow Corning, USA), was chosen. This is a pure silicone fluid, which was designed for the use in food processing or in other applications where a food-grade product is desired. PDMS is non-polar, chemically inert with high solubility for gases such as oxygen or carbon dioxide.

### *2.3 Bioreactor operation and conditions*

Batch cultivations were carried in a 2 L working volume stirred bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) filled with 2 L of medium. The bioreactor was equipped with temperature, agitation, aeration, and pH controllers and two Rushton turbines with six flat-blades. The culture medium used was optimized in a previous study [20], and contained (in g/L): peptone, 10; yeast extract, 5; raw glycerol from biodiesel synthesis, 30; olive oil, 6; soybean oil, 5. The raw glycerol was used as the sole carbon source for cell growth and its composition was (in a weight basis): 82.8 % glycerol, 5.5 % ashes, 5.9 % NaCl, 11.2 % moisture, 0.5 % monoacylglycerols, and pH 4.84. The concentration of polydimethylsiloxane was optimized and varied according to the experimental design (Table 2). The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The optimized temperature and pH were 37°C and 7.0, respectively [20]. The tested values of the oxygen volumetric mass transfer coefficient,  $k_{La}$ , were determined by the dynamic gassing-out method [15]. The agitation and aeration rates were set at different values, characterizing five different oxygen transfer conditions. Samples were taken along the cultivation in order to quantify lipolytic and proteolytic activities, biomass, and raw glycerol concentration.

#### 2.4. Experimental design and optimization of oxygen volumetric mass transfer coefficient

A  $2^3$  full-factorial composite design with five coded levels leading to 18 sets of experiments was carried in order to optimize the  $k_{La}$  as a function of aeration, agitation, and PDMS concentration. For statistical calculation, the variables were coded according to Eq. (1):

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (1)$$

Where  $x_i$  is the independent variable coded value;  $X_i$  is the independent variable real value;  $X_0$  is the independent variable real value on the central point; and  $\Delta X_i$  is the step change value.

The range and the levels of the variables investigated in this research are given in Table 1. The  $k_{La}$  was the dependent variable or response of the design experiments.

Table 1. Process variables and their levels used in CCD of  $k_{La}$  study.

Trial n°	Coded variables			Uncoded variables			$k_{La}$ (h <sup>-1</sup> )
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	-1	-1	-1	3	1.9	480	57
2	-1	-1	+1	3	1.9	720	115
3	-1	+1	-1	3	4.1	480	58
4	-1	+1	+1	3	4.1	720	120
5	+1	-1	-1	12	1.9	480	58
6	+1	-1	+1	12	1.9	720	130
7	+1	+1	-1	12	4.1	480	69
8	+1	+1	+1	12	4.1	720	133
9	-1.68	0	0	0	3	600	47
10	+1.68	0	0	15	3	600	120
11	0	-1.68	0	7.5	1	600	109
12	0	+1.68	0	7.5	5	600	112
13	0	0	-1.68	7.5	3	400	57
14	0	0	+1.68	7.5	3	800	180
15	0	0	0	7.5	3	600	85
15	0	0	0	7.5	3	600	86
15	0	0	0	7.5	3	600	87

X<sub>1</sub>= PDMS concentration (%), X<sub>2</sub>= aeration (vvm), X<sub>3</sub>= agitation speed (rpm)

The quadratic model for predicting the optimal point was expressed according to Eq.

(2):

$$Y_c = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (2)$$

where  $Y_c$  is the response variable,  $\beta_0$  the constant,  $\beta_i$  the coefficient for the linear effect,  $\beta_{ii}$  the coefficient for the quadratic effect,  $\beta_{ij}$  the coefficient for the interaction effect,  $x_i$  and  $x_j$  are the coded level of variable  $X_i$  and  $X_j$ . The agitation and aeration rates were set at different values, characterizing nine different oxygen transfer conditions, used in planning experiments for the optimization of lipase.

### 2.5. Experimental design and optimization of lipase production

A  $2^2$  full-factorial composite design with five coded levels leading to 12 sets of experiments was carried in order to optimize the lipase production as a function of  $k_{La}$  and PDMS concentration. For statistical calculation, the variables were coded according to Eq. (1). The range and the levels of the variables investigated in this research are given in Table 2.

Table 2. Process variables and their levels used in CCD of activity lipase study.

Trial n°	Coded variables		Uncoded variables		Activity Lipase (U/L)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	-1	-1	2.2	102	232
2	-1	+1	2.2	170	300
3	+1	-1	12.8	102	332
4	+1	+1	12.8	170	536
5	-1.41	0	0	136	108
6	+1.41	0	15	136	428
7	0	-1.41	7.5	89	280
8	0	+1.41	7.5	184	342
9	0	0	7.5	136	260
9	0	0	7.5	136	289
9	0	0	7.5	136	290

$X_1 = \text{PDMS concentration (\%)}$ ,  $X_2 = k_{La} (\text{h}^{-1})$

The lipase production was the dependent variable or response of the design experiments. The quadratic model for predicting the optimal point was expressed according to Eq. (2).

For both experimental designs, Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, USA) was used for regression and graphical analysis of the data. The significance of the regression coefficients was determined by the Student's t-test; and the second-order model equation was determined

by the Fischer's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination,  $R^2$ .

## 2.6. Analytical methods

The cell-free supernatant of the culture medium, referred as the crude enzyme extract, was used for the estimation of enzyme activities and for raw glycerol concentration determinations.

Lipolytic activity was determined using p-nitrophenyl palmitate (pNPP) as the substrate. A volume of 0.15 mL of crude enzyme extract was mixed with 1.35 mL of the prepared substrate solution and incubated at 37°C for 15 min in water bath. Control containing heat-inactivated enzyme was also incubated for each assay. The mixture was centrifuged (14,000 g, 10 min, 10°C) and the reaction was measured as absorbance at 410 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that liberated 1  $\mu\text{mol}$  p-nitrophenol per min at 37 °C. Under these conditions, the extinction coefficient of p-nitrophenol is  $13.23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Proteolytic activity was measured by the azocasein method, according to Sarath et al. [18]. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to produce the change in one unit of absorbance under the conditions of the method.

Biomass was quantified gravimetrically as cell dry weight. Samples were centrifuged, twice washed with cold hydroalcoholic solution (20 %), and dried at 80°C to a constant weight. Raw glycerol concentration was determined by HPLC with a refractive index (RI) detector (Perkin Elmer Series 200, USA) and a Phenomenex RHM monosaccharide column (300 x 7.8 mm), at 80°C, using ultrapure water as eluent, flow of 0.6 mL/min and sample volume of 20  $\mu\text{L}$ .

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of $k_{La}$

The use of  $k_{La}$  is important since it allows for comparisons among different bioreactor systems, being the best way to correlate agitation/aeration of different equipments and conditions. It is also the method of choice for scaling-up aerated bioprocesses. Therefore, experiments were performed to analyze the combined influences of agitation speed, aeration rate, and polydimethylsiloxane (PDMS) on  $k_{La}$  of Rushton turbine-equipped bioreactors. Table 1 shows both coded and real values of the variables at different levels.

The high significances of linear effects of agitation speed and concentration of PDMS indicate that these variables can act as limiting factors and even small variations in their values will alter the  $k_{La}$ . The results also showed that the variations of the aeration rate were not statistically significant for  $k_{La}$ . The second-order polynomial model for  $k_{La}$  can be reduced as expressed in Eq. (3):

$$Y_1 = 86.82 + 23.83 X_1 + 67.78 X_3 \quad (3)$$

Where the variables take their coded values, representing  $k_{La}$  ( $Y_1$ ) as a function of concentration of PDMS ( $X_1$ ) and agitation speed ( $X_3$ ).

ANOVA showed that the model was highly significant ( $P < 0.0001$ ), with  $R^2 = 0.9261$ , meaning that 92 % of the total variation is explained by the model. This suggests a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental and predicted values.

The entire relationship between reaction variables and response can be better understood by the contour shapes depicted in Fig. 1, plotted on the basis of the model

equation and showing the interaction among the concentration of PDMS and agitation speed for  $k_{La}$  values.

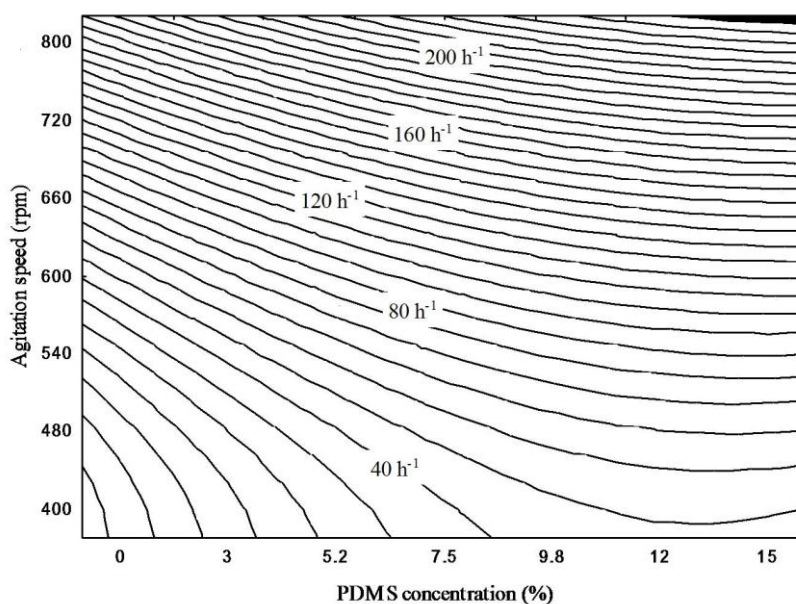


Fig 1. Contour plots of  $k_{La}$  determination. The numbers inside the contour lines indicate  $k_{La}$  values in  $h^{-1}$ .

The use of oxygen carriers for improving  $k_{La}$  in microbial cultures has been attempted before for PFCs but not for PDMS. In our study, the use of PDMS produced a 3.8-fold increase of the  $k_{La}$  coefficient. In comparison, Rols et al. [17] demonstrated that the use of the hydrocarbon *n*-dodecane and the perfluorocarbon Forane F66E in a culture of *Aerobacter aerogenes* resulted in a 3.5-fold increase of  $k_{La}$ . Cho and Wang [3] showed a 2 to 5-fold increase in  $k_{La}$  when a spraying of air-saturated perfluorocarbon was added to a bioreactor designed for cultivation of hybridoma cells. Rols and Gona [16] demonstrated that the use of 19 % of soybean oil enabled a 1.48-fold increase of the  $k_{La}$  coefficient.

- 3.2. *Optimization of lipase production as a function of  $k_{La}$  and PDMS concentration*

Hence determined the operational variables to define  $k_{La}$ , a second CCD was carried out in order to study the effects of the combined effects of  $k_{La}$  and PDMS concentration over lipase production by *S. warneri* EX17. The range of values for  $k_{La}$  and PDMS concentration for this second CCD were chosen to match values normally found in the literature for PFCs. The results are shown in Table 2. The high significance of the linear effects of  $k_{La}$  and PDMS concentration indicates that these variables can act as limiting factor and even small variations in their values will alter the lipase production. The regression is statistically significant ( $P < 0.001$ ) at 95 % of confidence level, and the model has a high determination coefficient ( $R^2 = 0.88$ ) explaining 88 % of the variability in the response.

The model expressed by Eq.(4), in its reduced form where the variables take their coded values, represents lipase activity ( $Y_1$ ) as a function of PDMS concentration ( $X_1$ ) and  $k_{La}$  ( $X_2$ ):

$$Y_1 = 279.66 + 197 X_1 + 89.62 X_2 \quad (4)$$

The contour plot described by the model equation ( $Y_1$ ) is represented in Fig. 2. The maximal enzymatic activity (536 U/L) was obtained for the condition 4 (12.8 % PDMS and  $k_{La}$  of  $170 \text{ h}^{-1}$ ), while the optimized model shows 13.5 % PDMS and  $k_{La}$  of  $181 \text{ h}^{-1}$  as the optima values for these variables. The lowest enzymatic activity (108 U/L) was obtained for the condition five (0 % PDMS and  $k_{La}$  of  $136 \text{ h}^{-1}$ ). Therefore, our results clearly show that the use of PDMS increases lipase activity by a factor of 5 times.



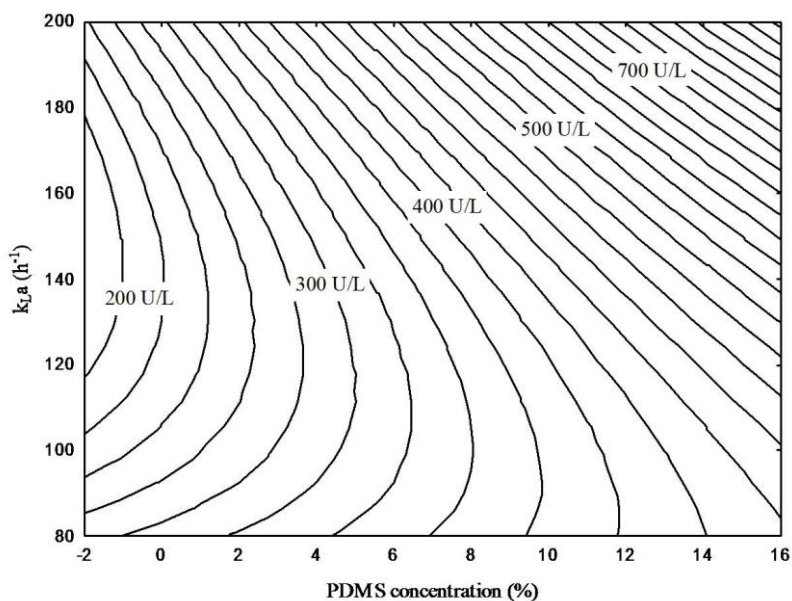


Fig 2. Level curve described by the model  $Y_2$  which represents lipolytic activity (U/L).

Validation of the model was performed using the optimized values for  $k_{La}$  and PDMS concentration and results for the cultivation kinetics are shown in Fig. 3. A maximal cell production of 10.0 g/L, and lipase activity of approximately 490 U/L were obtained after 6 h of cultivation. These results are in close agreement with the model predictions. In order to check for proteolysis of lipases, the batches were evaluated for the proteolytic activity in the medium, which was neglectable (results not shown).

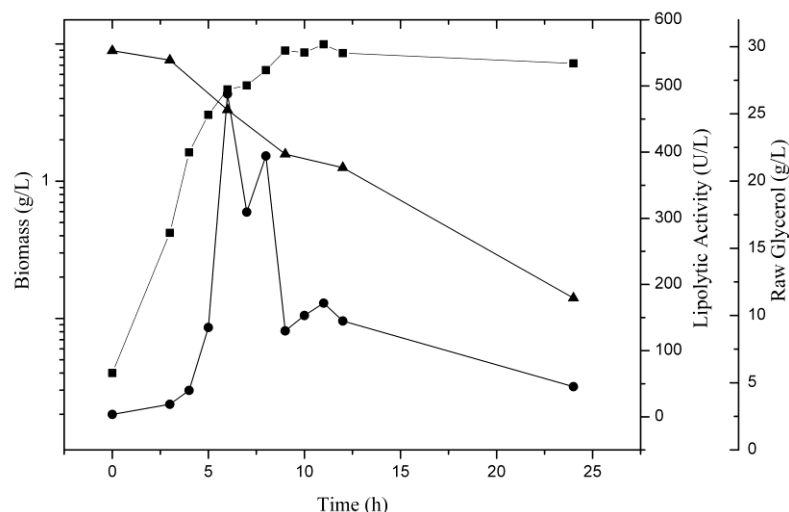


Fig. 3: The time course of lipase production by *S. warneri* EX17 cultivated under optimized culture conditions. (■) Dry cell weight, (●) lipolytic activity, (▲) glycerol concentration.

Surprisingly, the culture time for the highest lipase activity was reduced by half in the presence of PDMS. In a previous work, we found the lipase activity of *S. warneri* EX17 always peaked after 12 hours of cultivation under optimized conditions, similar to those used in this work, but without PDMS [20]. This is an extremely important result since anticipating the coupled time production of the enzyme reduces costs in the bioprocesses. This result may be related to the aerobic metabolism of the microorganism. Elibol and Mavituna [8], attributed the increase in the antibiotic production of *S. coelicolor* cultures to the enhancement of oxygen transfer due the presence of 50 % of PFC in the fermentation medium.

Although a few works reported on the effects of PDMS addition to microbial cultures for other reactions, this research is the first to report on the use of PDMS in an experimental design to enhance lipase activity. Leonhardt et al. [14], PDMS to provide oxygen during  $\alpha$ -keto-acid production by immobilized bacteria and found an increase of L-amino acid oxidase activity by a factor of four in the presence of silicon emulsions. Zimoeck et al. [22], studied the biological bleaching of hardwood Kraft pulp with *T. versicolor* and observed a three-fold increase in the oxygen uptake rate in cultures of this fungus when PDMS was added to the medium.

- Since the synthesis of this enzyme is clearly influenced by the oxygen available in cultures, some authors attempted to demonstrate the positive effects of adding chemical oxygen carriers for this purpose. Elibol and Ozer [6] investigated the addition of 10 % (v/v) of the perfluorocarbon perfluorodecalin to culture medium for the production of lipase by the fungus *Rhizopus arrhizus*. The authors showed an increase in lipase production by a factor of 8.5 times. Amaral et al. [1] investigated the effect of PFC on the lipase production by *Yarrowia lipolytica*, reporting an increase of up to 23 times in the enzyme activity when 20 % (v/v) of PFC was used in the culture medium compared to control without PFC. In all these works, PFCs have been shown to increase the enzyme activities, without reducing the production time.

The low costs of PMDS associated with the reduced time for production of the enzyme makes these compounds attractive for applications in fermentation processes.

In this study, all experiments were carried out using raw glycerol from biodiesel synthesis as the sole carbon source. Although this was not the central objective of the work presented here, this fact is important, because our results show that this cheap and abundant substrate can be successfully used for lipase production. In preliminary experiments in shaker, production of lipase in raw glycerol did not differ significantly from cultivation with pure glycerol (results not shown). In a previous work, we used raw glycerol to produce lipase by *S. caseolitycus* EX17 and found that there was no difference in enzyme production and cell growth compared to pure glycerol [20].

#### **4. Conclusions**

Oxygen supply to microbial cultures is a critical operation to ensure productivity in aerobic cultures. In the present study we demonstrated that PDMS is an effective oxygen carrier, increasing 5-fold the oxygen volumetric mass transfer coefficients in submerged

bioreactors, under the conditions of this work. This is the first report on the literature on the effects of PMDS as an oxygen carrier capable of influencing  $k_{La}$ . PMDS is non-toxic and cheap, in contrast with perfluorocarbons, so far the most studied liquid oxygen carriers. The application of statistical tools of CCD in order to study the combined effects of PMDS and  $k_{La}$  on cultures of *S. warneri* EX17 was successful to increase lipase activity and predicting optimal amounts of PMDS and  $k_{La}$  values that could be used in scaling-up this bioprocess. Furthermore, the utilization of low cost substrates such as residual glycerol from biodiesel synthesis can reduce the overall costs for lipase production. As shown in this research, with the combined increase of productivity and cost reduction, the industrial production of lipase by *Staphylococcus warneri* EX 17 can hold the prospect of being economically attractive.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank The Brazilian Bureau for Science & Technology (CNPQ) and CAPES for their financial support for this project and the scholarship for the first author.

## References

1. Amaral PFF, Almeida AP, Peixoto T, Rocha-Leão MHM, Coutinho JAP, Coelho MA (2007) Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 339-344
2. Chen JY, Wen CM, Chen TL (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol Bioeng* 62: 311-316
3. Cho MH and Wang SS (1988) Enhancement of oxygen transfer in hybridoma cell culture by using a perfluorocarbon as an oxygen carrier. *Biotechnol Lett* 10: 855-860
4. Dey E S, Norrflow Y Liu (2004) Artificial carrier for oxygen supply in biological systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:187-191
5. Elibol M (2002) Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium. *Proc Biochem* 38: P667- 673
6. Elibol M and Ozer D (2000) Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Proc Biochem* 36: 325-329
7. Elibol M (1999) Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68. *Proc Biochem* 34: 557-561
8. Elibol M, Mavituna F (1999) A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: addition of perfluorocarbon. *Biochem Eng J* 3: 1-7
9. Gilmour SG (2006) Response surface designs for experiments in bioprocessing. *Biometrics* 62: 323-331
10. GuptaR, Gupta N, Rathi P (2004a) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 763-781
11. Jaeger KE, Eggert T (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13: 390-397

12. Jaeger KE, Reetz MT (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16: 396-403
13. Kalil SJ, Maugeri F, Rodrigues MI (2000) Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Proc Biochem* 35: 539-550
14. Leonhardt A, Sz wajcer E, Mosbach K (1985) The potential use of silicon compounds as oxygen carriers for free and immobilized cells containing L-amino acid oxidase. *Appl Microb Biotechnol* 21:162-166
15. Pouliot K, Thibault J, Garnier A, Leiva GA (2000)  $K_{La}$  evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Eng* 23: 565-573
16. Rols JL, Condoret JS, Fonade C, Goma G (1990) Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors. *Biotechnol Bioeng* 35: 427-435
17. Rols JL, Goma G (1991) Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil in water dispersions. *Biotechnol Lett* 13: 7-12
18. Sarath G, Motte RS, Wagner FW (1989) Proteases assay methods. In: *Proteolytic enzymes: a practical approach* eds. R.J. Beyon, J.S. Bond. IRL, Oxford, p.259.
19. Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ (2008) Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *J. Chem Technol Biotechnol* 83:821-828
20. Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ (2008) Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. *Biotechnol and Bioproc Eng* 14:105-111
21. Wang J, Li Sh, Mo J-W, Porter J, Musameh MM, Dasgupta PK (2002) Oxygen-independent polydimethylsiloxane based carbon paste glucose biosensors. *Biosens Bioelec* 17:999-1003

22. Ziomek E, Kirkpatrick N, Reid D I (1991) Effect of polydimethylsiloxane oxygen carriers on the biological bleaching of hardwood kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl Microb Biotechnol* 35: 660-673

## **2.2. Resultados II – Effect of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17**

O segundo artigo intitulado “**Effect of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17**” avalia a utilização de emulsified polydimethylsiloxane FG-10 e da velocidade de agitação no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e produção de lipase. Este artigo foi submetido ao periódico Process Biochemistry.



**Effect of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ )  
and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17**

**Fernanda Roberta Rech<sup>1</sup>, Giandra Volpato<sup>2</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1\*</sup>**

**<sup>1</sup>BiotecLab (Food Science & Technology Institute), Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.**

**<sup>2</sup>Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA, Av. Ipiranga, 6681, Tecnopuc, Predio 92A, Partenon, ZC 90619900, Porto Alegre, RS, Brazil.**

**Abstract**

It was investigated the effects of the emulsified polydimethylsiloxane (PMDS) FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) of submerged cultures of *Staphylococcus warneri* EX17 and its lipase production. FG-10 is an emulsified silicone, which has an oxygen solubility 50 times higher than water, very similar to other chemical oxygen carriers such as perfluorocarbons, but much cheaper. The combined effects of FG-10 concentration and different conditions of agitation were optimized using statistical design. The optimal concentration of FG-10 and agitation were found to be 11.2% and 527 rpm, respectively, in order to boost lipase production, with higher activities around 861 U/L, a maximal cell production of 8.4 g/L, and  $k_{La}$  99 h<sup>-1</sup>, values approximately 3 times than cultures without FG-10. This is the first report

---

\* Corresponding author. Phone: +55 51 3308 6685; Fax +55 51 3308 7048;  
e-mail mazayub@ufrgs.br

on the literature about the use of this class of chemicals as oxygen carriers for microbial cultures.

*Keywords:* Polydimethylsiloxanes, FG-10, *Staphylococcus warneri* EX17, lipases, oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ).

## 1. Introduction

Lipases (triacylglycerol hydrolase, E.C. 3.1.1.3) are lipolytic enzymes that catalyze the industrial important reactions of esterification and transesterification, and are extensively used in the food, detergent, and chemical industries, and in biomedical research [1]. Lipases can be obtained from animal and plant sources, but microbial sources are far more important from the industrial point of view, since they can be produced in large scale and show good stability, selectivity, and broad substrate specificity [2]. Some important lipase-producing bacterial genera include *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* [3].

Microbial lipases productions are affected by cultivation conditions and, in particular, some authors have indicated the oxygen transfer rate as a key factor influencing the productivity of this enzyme [4-6]. Oxygen volumetric mass transfer rate is usually a critical parameter in microbial aerobic cultures because of its parch solubility and the need for constant supply. Selection, design, and the scaling up of biochemical reactors, along with the accurate estimation of mass transfer rates for different scales and different operational conditions are of critical importance in bioprocesses [7].

The oxygen transfer rate can be described and analyzed by means of oxygen volumetric mass transfer coefficient,  $k_{La}$  [6]. As any other transport phenomena taking place between different phases, oxygen transfer rate is deeply influenced by the hydrodynamic conditions in the bioreactor that can affect the mass transfer coefficient and the interfacial area. Therefore, variations in the configuration of bioreactors and the physicochemical

properties of the culture medium, such as the rheological properties, diffusivity, and surface tension, can interfere the oxygen transfer capacity and lead to oxygen depletion [8].

Some of the new methods formulated to improve oxygen supply in aerobic microbial culture include the manipulation of microbial metabolism through genetic engineering and the use of oxygen carriers such as hydrocarbons, haemoglobin and perfluorocarbons, often simply referred as perfluorocarbons or PFCs [9]. An additional artificial oxygen carrier consists of liquid silicone polydimethylsiloxane (PDMS), copolymer with ethylene or propylene oxide, designed by Leonhard et al. [10], in which oxygen solubility is about 45 to 50 times higher than in water. PDMS is cheaper than PFCs; it is also physicochemically stable and biologically safe, ease to handle and has been used to efficiently supply oxygen in some enzymatic reactions [11], and as detergents in lipase kinetics studies [12,13]. However, it has barely been tried for microbial cultivations [10].

The use of statistical approaches involving central composite design (CCD) and the response surface methodology (RSM) has been widely used for the optimization of bioprocesses and is now a standard procedure [14]. The CCD is an efficient strategic experimental tool in order to determine the optimal conditions of a multivariable system with a minimum of experiments, saving time and costs [15].

The aim of this work was to optimize by CCD the use of the emulsified form of PDMS, commercially known as FG-10, in combination with the optimal oxygen volumetric mass transfer rate ( $k_{La}$ ) as a function of agitation speed in submerged bioreactor cultures of *Staphylococcus warneri* EX17 to produce lipase. This is the very first report on the literature on the use of this chemical as an oxygen carrier and can be considered as a model for future investigations on aerobic microbial cultures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganism, cultures maintenance and inoculum preparation

A strain of *Staphylococcus* isolated by our group from an abattoir fat-rich wastewater was used in this research. This strain was identified by 16S rDNA gene sequencing and identified as *Staphylococcus warneri* strain EX17 [16]; it is kept as a certified stock at Microbiology Culture Collection of BiotecLab (UFRGS, Brazil). Working stocks of cultures were maintained in 20% glycerol suspension frozen at -18 °C, while for immediate use cells were kept at 4 °C on tributyrin agar plate containing (in g/L): peptone, 5; yeast extract, 3; tributyrin, 10. Pre-inocula for cultivations were carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks filled with 200 mL of LB medium inoculated with a loopful from the plate cultures and incubated at 37 °C, 180 rpm, until cultures reached an optical density (OD, Abs at 600 nm) of 1.0 and were then transferred to the bioreactors.

### 2.2. Emulsified polydimethylsiloxane

For the purposes of testing improved oxygen transfer mechanisms in the cultures, the chemical PDMS FG-10 was chosen (Dow Corning, USA). FG-10 is a 10% active emulsified silicone; it is a non-ionic silicone, which is used as antifoam in food and vegetables processing and waste water treatments.

### 2.3 Oxygen volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) determination

The dissolved oxygen concentration of cultures was measured using a polarographic oxygen electrode (Mettler-Toledo, USA). The volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) was determined using the static gassing-out method, described by Pouliot et al. [17]. This method is performed by first sparging pure nitrogen to completely eliminate oxygen from medium and then monitoring the dissolved oxygen concentration ( $C$ ) after the start of aeration with

compressed air (approximately 21% oxygen). The following equation was used to calculate  $k_La$  from the slope of the plot obtained:

$$k_La = \ln(1 - C/C^*) \quad (1)$$

Where  $C^*$  is the dissolved oxygen concentration in equilibrium between gas and liquid [ $\text{mgO}_2/\text{L}$ ],  $C$  is the medium dissolved oxygen concentration after the start of aeration [ $\text{mgO}_2/\text{L}$ ], and  $t$  is the elapsed measured time [h]. The time constant of the polarographic oxygen electrode used is in the range of 3–5 s. Due to this low value, the mass transfer data analysis is simplified by assuming a well mixed system and neglecting the influence of probe lag and gas phase dynamics.

#### 2.4. Bioreactor cultures

Batch cultivations were carried in 2 L working volume stirred tank bioreactors (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) filled with 2 L of medium. The bioreactors were equipped with temperature, agitation, aeration, and pH controllers and two Rushton turbines with six flat-blades. The culture medium used was optimized in a previous study [18] and contained (in g/L): peptone, 10; yeast extract, 5; raw glycerol from biodiesel synthesis, 30; olive oil, 6; soybean oil, 5. The raw glycerol was used as the sole carbon source for cell growth and its composition was (in a weight basis): 82.8 % glycerol, 5.5 % ashes, 5.9 % NaCl, 11.2 % moisture, 0.5 % monoacylglycerols, and pH 4.84. The concentration of FG-10 was optimized and varied according to treatment applied. The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The culture temperature and pH were 37 °C and 7.0, respectively, and these values were previously optimized in another work [18]. The agitation speed was set at different values according to the CCD (Table 1), while the air flow rate was

kept constant at 2 vvm. Samples were taken throughout cultivation in order to determine lipolytic and proteolytic activities, biomass, and the raw glycerol concentration.

### 2.5. Experimental design and optimization of lipase production

A  $2^2$  full-factorial composite design with five coded levels leading to 12 sets of experiments was performed. For statistical calculation, the variables were coded according to Eq. (2):

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (2)$$

Where  $x_i$  is the independent variable coded value;  $X_i$  independent variable real value;  $X_0$  independent variable real value on the central point; and  $\Delta X_i$  the step change value.

The range and the levels of the variables investigated in this research are given in Table 1. The lipase production and  $k_{La}$  were taking as the dependent variable or response of the design experiments.

Table 1. Process Experimental design for  $k_{La}$  values and lipase production

Trial n°	Coded variables		Uncoded variables		Lipase activity (U/L)	$k_{La}$ ( $h^{-1}$ )
	$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$		
1	-1	-1	2.9	287	298	46
2	-1	+1	2.9	713	633	100
3	+1	-1	17.1	287	615	78
4	+1	+1	17.1	713	730	137
5	-1.41	0	0	500	380	38
6	+1.41	0	20	500	385	87
7	0	-1.41	10	200	430	60
8	0	+1.41	10	800	385	139
9	0	0	10	500	773	99
9	0	0	10	500	867	98
9	0	0	10	500	864	99

$X_1$ = Antifoam FG- 10 concentration (%),  $X_2$ = Agitation speed (rpm)

The quadratic model for predicting the optimal point was expressed according to Eq. (3):

$$Y_c = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (3)$$

Where  $Y_c$  is the response calculated by the model;  $x_i, x_j$ , coded variables corresponding to factors  $X_i, X_j$ , respectively;  $\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ , coefficients estimated by the model. They represent the linear, quadratic and cross-product effects of the  $X_i, X_j$  factors on the response, respectively.

Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, UK, USA), was used for regression and graphical analysis of the data. The significance of the regression coefficients was determined by Student's t-test; the second-order model equation was determined by Fischer's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination,  $R^2$ .

## 2.6. Analytical methods

The cell-free supernatant of the culture medium, referred as the crude enzyme extract, was used for the estimation of enzyme activities and for raw glycerol concentration determinations.

Lipolytic activity was determined using p-nitrophenyl palmitate (pNPP) as the substrate. A volume of 0.15 ml of crude enzyme extract was mixed with 1.35 ml of the prepared substrate solution and incubated at 37°C for 15 min in water bath. Control containing heat-inactivated enzyme was also incubated for each assay. The mixture was centrifuged (14,000 g, 10 min, 10°C) and the reaction was measured as absorbance at 410 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that liberated 1  $\mu\text{mol}$  p-nitrophenol per min at 37 °C. Under these conditions the extinction coefficient of p-nitrophenol is  $13.23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Proteolytic activity was measured by the azocasein method, according to Sarath et al. [19]. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to produce the change in one unit of absorbance under the conditions of the method.

Biomass was quantified gravimetrically as cell dry weight. Samples were centrifuged, washed twice with cold hydroalcoholic solution (20 % of ethanol), and dried at 80°C to a constant weight. Raw glycerol concentration was determined by HPLC with a refractive index (RI) detector (Perkin Elmer Series 200, USA) and a Phenomenex RHM monosaccharide column (300 x 7.8 mm), at 80°C, using ultrapure water as eluent, flow of 0.6 ml/min and sample volume of 20 µL.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Effects FG-10 concentration and agitation on $k_La$

In the present work, experiments were planned to obtain a quadratic model consisting of  $2^2$  trials plus a star configuration ( $\alpha \pm 1.41$ ) and three replicates at the central point. The design of this experiment is given in Table 1, together with the experimental results.

The model expressed by Eq. (3), where the variables take their coded values, represents  $k_{La}$  ( $Y_1$ ) as a function of PDMS concentration ( $X_1$ ) and agitation ( $X_2$ ):

$$Y_1 = 99.19 + 34.31 X_1 + 56.32 X_2 - 33.74 X_1^2 + 6.17 X_2^2 + 2.50 X_1 X_2 \quad (4)$$

ANOVA showed that the model was highly significant ( $P < 0.0001$ ), with  $R^2 = 0.9808$ ; thus 98.08 % of the total variation is explained by the model. All factors and interactions had a positive effect on the coefficient of oxygen transfer. The results obtained in this research show very clearly that the FG-10 is an effective oxygen carrier in microbial cultures.

The entire relationship between reaction variables and response can be better understood by the contour shapes depicted in Figure 1, plotted on the basis of the model



equation 3 and showing the interaction between the concentration of FG-10 and agitation speed over  $k_La$  values, which is strongly affected by both variables.

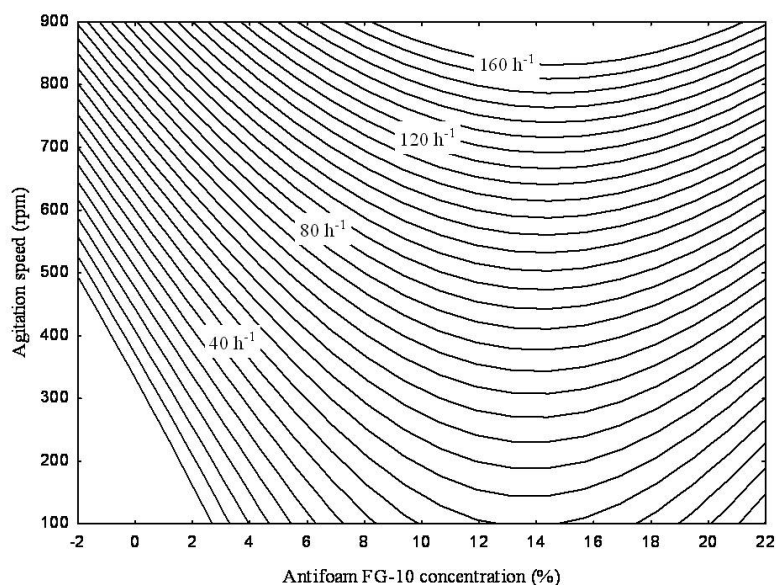


Figure 1. Contour plots of  $k_La$  determination. The numbers inside the contour lines indicate  $k_La$  values in  $h^{-1}$ .

The optimal values for  $k_La$  were obtained for the combination of FG-10 varying from 10 to 17 % and agitation speed between 700 and 800 rpm, with an increase of 3.7 times for this dependent variable. Elibol [20] demonstrated that the use of 15% of PFC produced a 2.5-fold increase of the  $k_La$  coefficient in cultures of *S. coelicolor*. Rols et al. [21] demonstrated that the use of the hydrocarbon *n*-dodecane and the perfluorocarbon Forane F66E in cultures of *Aerobacter aerogenes* resulted in a 3.5-fold increase of  $k_La$ . The reasons for attributing enhanced effect over  $k_La$  by FG-10 can be explained by the formation of droplets of this vector in a liquid biphasic system. If the vector droplets are assimilated into rigid spheres, they may interact dynamically with the water boundary layer of the gaseous dispersion (provided by air supply and agitation) and therefore increase the turbulence or mixing in this layer. Moreover, since the oxygen solubilities in oxygen carriers such as antifoam FG-10 are

higher than in water, oxygen permeability within the biphasic liquid boundary layer is enhanced because of the vector droplets located within this layer. In an early and very elegant study, when oxygen carriers were not available, Wise et al. [22] studied the oxygen transfer mechanisms in cultures of *Pseudomonas ovalis* and *Candida intermedia* and attributed the enhanced mass transfer rates caused by cells to the disruption of the quasi-static liquid surface film surrounding the gas bubbles.

### 3.2 Effects FG-10 concentration and agitation on lipase production

Microbial lipase production has always been proposed as an aerobic process. Consequently, it demands a constant supply of oxygen. The experimental design showing the effects of enhanced oxygen supply on lipase activity is given in Table 1, along with the

The model expressed by Eq. (5), where the variables take their coded experimental results.

values, represents enzymatic activity ( $Y_2$ ) as a function of FG-10 concentration ( $X_1$ ) and agitation speed ( $X_2$ ):

$$Y_2 = 825.29 + 97.88 X_1 + 94.15 X_2 - 371.13 X_1^2 - 324.41 X_2^2 + 103.02 X_1 X_2 \quad (5)$$

This model can be simplified by the elimination of statistically insignificant terms and can be rewritten as Eq. (6):

$$Y_2 = 825.29 - 371.13 X_1^2 - 324.41 X_2^2 \quad (6)$$

The quadratic coefficients for FG-10 concentration and agitation speed on lipase activity were highly significant. Lipolytic activity seems to be more affected by antifoam FG-10 concentration than agitation speed. For lower agitation speeds (< 200 rpm), oxygen transfer limitations were observed since culture medium was poorly mixed. On the other

hand, for high values of agitation speed (800 rpm), the production of lipase negatively affected, likely because cell destruction by shear force.

ANOVA showed that the model was significant ( $P = 0.0013$ ), with  $R^2 = 0.6788$ ; thus 67.88 % of the total variation is explained by the model. The correlation between the experimental and predicted values were somewhat unsatisfactory for the lipolytic activity, but since the results obtained for the triplicated central point were very close, indicating good experimental procedures, this result may demonstrate the high process variability for this quadriphasic system.

The entire relationship between reaction variables and response can be better understood by the contour shapes depicted in Figure 2, plotted on the basis of the model equation 5 and showing the interaction between the concentration of FG-10 agitation speed over lipolytic activity.

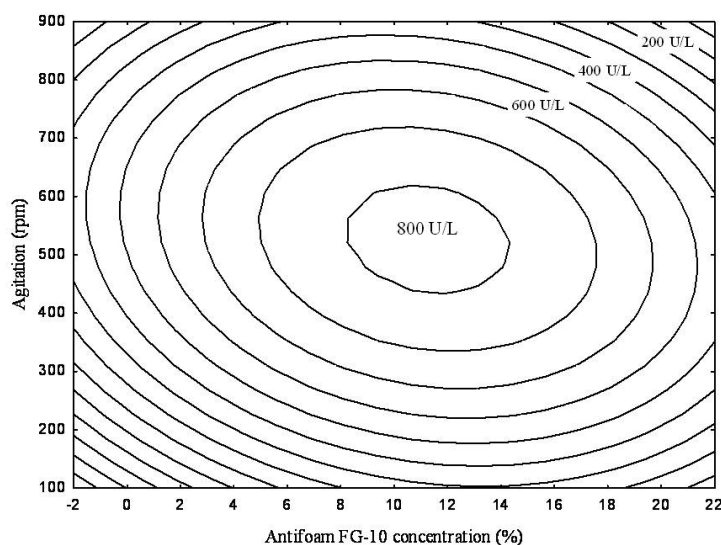


Figure 2. Contour plots of determination lipolytic activity. The numbers inside the contour lines indicate the volumetric lipolytic activity.

To confirm the model obtained by statistical analysis, a validation experiment was performed under the optimal conditions and the results are shown in Figure 3.

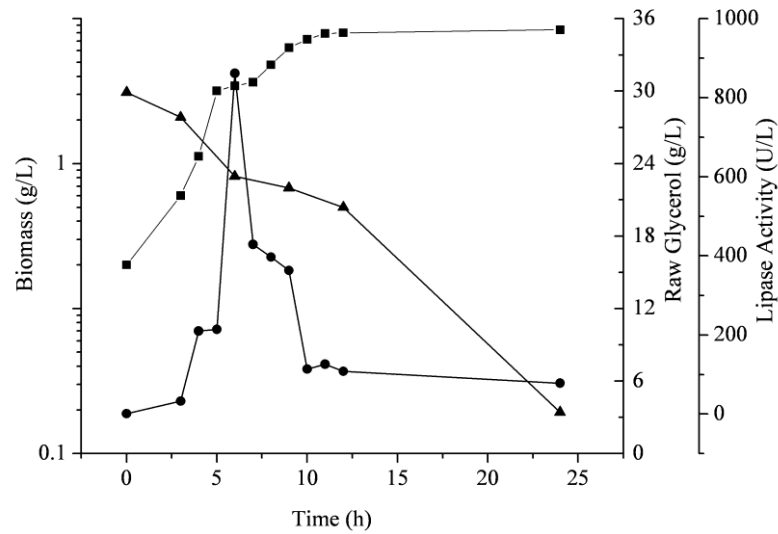


Figure 3. The time course of lipase production by *S. warneri* EX17 cultivated under optimized culture conditions. (■) biomass, (▲) glycerol concentration, (●) lipolytic activity.

The data show that the model is valid for the production of lipase by *S. warneri* EX17, with optimal FG-10 concentration and agitation speed as 11.2% and 527 rpm, respectively, with maximal cell production of 8.4 g/L, and the volumetric lipase activity of 861 U/L, after only 6 h of cultivation, which is 2.5 times higher than for cultivations in the absence of FG-10 (run 5, Table 1).

Figure 4 illustrates very clearly the relationship between lipolytic activity and  $k_{La}$ , which can be modeled by the exponential equation (7):

$$\text{Lipase activity} = -a \cdot \exp(-k_{La}/t) + b \quad (7)$$

Where  $a$ ,  $b$ , and  $t$  are constants associated to  $k_{La}$  and lipase activity.

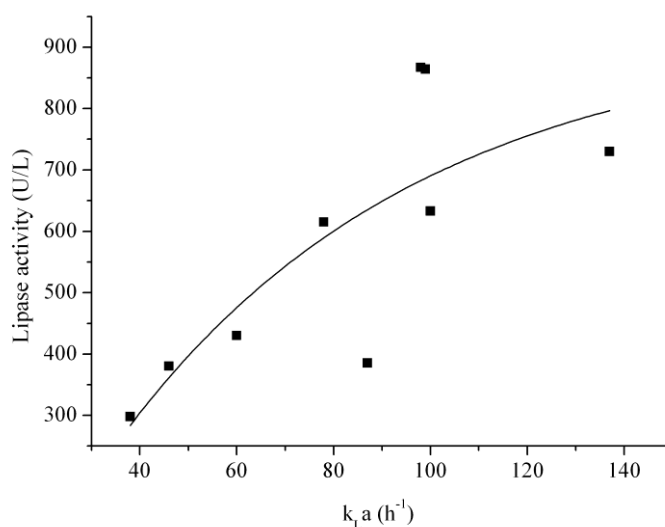


Figure 4. The relationship between lipolytic activity and  $k_L a$ .

This is the first report on the use of emulsified silicone FG-10 as a potential oxygen carrier to enhance oxygen supply to microbial cultures. As a comparison, Elibol and Mavituna [23] attributed the enhancement of antibiotic production by *S. coelicolor* cultures due to the higher oxygen solubilities of the fermentation medium by the addition of 50% perfluorodecalin. In another study, Elibol [24] added 10% PFC in the medium for the production of actinorhodin by *S. coelicolor*, which doubled the production of this antibiotic in relation to cultures without PFC. Dey et al. [13], using the same growth medium as described Elibol [24], but supplemented with only 0.1% (w/w) of non-emulsified PDMS, and reported that actinorhodin production was accelerated and 3 times higher when compared to growth without PDMS. Zimoeck et al. [25] also studied the effects of non-emulsified PDMS to improve the biological bleaching of hardwood Kraft pulp during the growth of fungal cells. The author observed a threefold increase in the oxygen uptake rate of immobilized *T. versicolor* in polyurethane foam with the addition of 0.5% of PDMS to cultures.

#### **4. Conclusions**

Lipases are enzymes with a growing industrial importance, especially due to the need for cheap and cleaner biodiesel production. This family of enzymes is consistently reported to be stimulated by the oxygen supply in microbial cultures. In the present study we demonstrated that the emulsified form of silicone FG-10 can work as an oxygen carrier for microbial cultivations, potentially increasing the oxygen volumetric mass transfer coefficient. FG-10 is non-toxic and cheap, contrasting with PFCs, which have been described as liquid oxygen carriers. The application of statistical tools such as CCD in order to study the combined effects of FG-10 and  $k_{La}$  on cultures of *S. warneri* EX17 was successful to increase lipase activity and predicting optimal values of these two variables that could be used in scaling-up this bioprocess. As it has been shown in this work, with the combined increase of productivity and cost reduction, the industrial production of microbial lipases can hold the prospect of being economically attractive for biodiesel synthesis.

#### **Acknowledgements**

The authors wish to thank The Brazilian Bureau for Science & Technology (CNPQ) and CAPES for their financial support for this project and the scholarship for the first author.

## References

- [1] Hasan, F, Ali Shah, A, Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39: 235-251.
- [2] Treichel, H, Oliveira, D, Mazutti, MA, Di Luccio, M, Oliveira, JV. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol* 2010; 3: 182-196.
- [3] Sharma, R, Chisti, Y, Banerjee, UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv* 2001; 19: 627-662.
- [4] Elibol, M, Ozer, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Proc Biochem* 2000; 36: 325-329.
- [5] Amaral, PFF, Almeida, AP, Peixoto, T, Rocha-Leão, MHM, Coutinho, JAP, Coelho, MA. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World J Microbiol Biotechnol* 2007; 23: 339-344.
- [6] Dominguez, AL, Pastrana, MA, Longo, ML, Rúa and Sanroman, MA. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem Eng* 2005; 26: 95-99.
- [7] Galaction, AI, Cascaval, D, Oniscu, C, Turnea, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochem Eng. J* 2004; 20: 85-94.
- [8] Garcia-Ochoa, F, Gómez, E. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 2005; 92: 761-772.
- [9] Elibol, M. Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium. *Proc Biochem* 2002; 38:667-673.

- [10] Leonhardt A, Szwajcer E, Mosbach K. The potential use of silicon compounds as oxygen carriers for free and immobilized cells containing L-amino acid oxidase. *Appl Microb Biotechnol* 1985; 21: 162-166.
- [11] Wang J, Li Sh, Mo JW, Porter J, Musameh MM, Dasgupta PK. Oxygen-independent polydimethylsiloxane based carbon paste glucose biosensors. *Biosens Bioelec* 2002; 17:999-1003.
- [12] Ziomek E, Douchet I, Ivanova M, Verger R. Interaction of a poly(dimethylsiloxane) with triglycerides in monomolecular films and application to lipase kinetics. *Chem Phys Lipids* 1996; 81:1-9.
- [13] Dey, ES, Norrflow, YL. Artificial carrier for oxygen supply in biological systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64; 187-191.
- [14] Kalil, SJ, Maugeri, F, Rodrigues, MI. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Proc Biochem* 2000; 35: 539-550.
- [15] Rodrigues, MI, Iemma, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.
- [16] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. *Biotechnol and Bioproc Eng* 2009; 14:105-111.
- [17] Pouliot, K, Thibault, J, Garnier, A, Leiva, GA.  $K_{La}$  evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Eng* 2000; 23: 565-573.
- [18] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *J Chem Technol Biotechnol* 2008; 83: 821-828.
- [19] Sarath, G, Motte, RS, Wagner, FW. Proteases assay methods. In: *Proteolytic enzymes: a practical approach*, eds. R.J. Beyon, J.S. Bond. IRL, Oxford, 1989 p.259.



- [20] Elibol, M. Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68. *Proc Biochem* 1999; 34: 557-561.
- [21] Rols, JL, Condoret, JS, Fonade, C, Goma, G. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors, *Biotechnol Bioeng* 1990; 35: 427-435.
- [22] Wise DL, Wang DIC, Matelles RI. Increased oxygen mass transfer rates from single bubbles in microbial systems at low Reynolds numbers. *Biotechnol Bioeng* 1969; 11: 647-81.
- [23] Elibol, M, Mavituna, F. A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: addition of perfluorocarbon. *Biochem Eng J* 1999; 3: 1-7.
- [24] Elibol, M. Improvement of antibiotic production by increased oxygen solubility through the addition of perfluorodecalin. *J Chem Tech Biotechnol* 2001; 76:418-422.
- [25] Ziomek E, Kirkpatrick , N, Reid, DI. Effect of polydimethylsiloxane oxygen carriers on the biological bleaching of hardwood kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Appl Microb Biotechnol* 1991; 35:660-673.

### 3. DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi abordado o potencial biotecnológico da utilização de glicerol residual, oriundo da síntese química de biodiesel, na produção de lipases de *S. warneri* EX17. Também foram utilizados polidimetilsiloxanos (PDMS), como potenciais carreadores de oxigênio. Na literatura existem poucos trabalhos que usam PDMS para melhorar a transferência de oxigênio em meios de cultivo. Muitos autores têm usado perfluorocarbonos (PFCs), mas esses compostos são muito mais caros quando comparados ao PDMS.

Primeiramente foram realizados estudos em incubadora rotatória horizontal usando meio previamente otimizado por Volpato et al. (2008), para comparar a produção de lipases em glicerol residual e glicerol comercial. A produção com os dois gliceróis foi semelhante, não apresentando diferenças significativas. Assim, os experimentos posteriores foram realizados com glicerol residual.

Testes preliminares também foram realizados em incubadora rotatória horizontal para avaliar a influência do uso de PDMS na produção de lipases. A produção da enzima foi significativamente maior no meio contendo PDMS. Então, utilizou-se ferramentas de planejamento experimental, delineamento central composto (DCC) para estudar a influência do PDMS no coeficiente de transferência de oxigênio  $k_La$  em meio de cultivo produtor de lipase, livre de células.

De acordo com os dados apresentados no primeiro artigo “Optimization of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 using the polydimethylsiloxanes artificial oxygen carriers”, o primeiro (DCC) foi usado como ferramenta para analisar os efeitos combinados das variáveis: velocidade de agitação (rpm), PDMS fluido (%) e aeração (vvm), sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_La$ ) em meio de cultivo

específico para a produção de lipases. Os resultados mostraram que apenas a velocidade de agitação e o PDMS interferiram significativamente no  $k_{La}$ .

Confirmando a hipótese inicial, que o PDMS aumenta o  $k_{La}$  e com isso a disponibilidade de oxigênio, desenhou-se um segundo DCC usando as variáveis PDMS e  $k_{La}$  (valores determinados experimentalmente) para otimizar a produção de lipases. A aeração por não ter sido estatisticamente significativa foi fixada em 2 vvm para todos os experimentos. A maior produção da enzima foi na condição 12,8% de PDMS e  $k_{La}$  170 h<sup>-1</sup> (536 U/L), cinco vezes maior que a condição de 0% de PDMS e  $k_{La}$  136 h<sup>-1</sup> (108 U/L).

Para a validação do modelo os valores ótimos de PDMS e  $k_{La}$  foram de 13,5% e 181 h<sup>-1</sup>, respectivamente. A máxima produção de células foi de 10 g/L e a atividade lipolítica foi de aproximadamente 490 U/L, obtidas após 6 h de cultivo. Os resultados obtidos estão de acordo com o modelo predito. Neste estudo demonstrou-se que o PDMS é um efetivo carreador de oxigênio, pois aumentou em 3,8 vezes o  $k_{La}$ . Rols et al. (1990) demonstraram que o uso de hidrocarbonetos e perfluorocarbonos, como carreadores de oxigênio, aumentaram 3,5 vezes o  $k_{La}$  em culturas de *Aerobacter aerogenes*. O aumento do  $k_{La}$ , aumenta conseqüentemente a produção da enzima. Neste estudo demonstrou-se que o uso de 12,8% aumentou 5 vezes a atividade da enzima. Elibol e Mavituna (1999) demonstraram que o uso de 50% de PFC aumentou significativamente a produção de antibiótico. Os autores atribuíram o aumento da produção a melhor disponibilidade de oxigênio.

Por existirem poucos estudos na literatura usando PDMS como carreadores de oxigênio, testou-se um PDMS emulsificado FG-10. Os resultados estão descritos no segundo artigo "Effect of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient ( $k_{La}$ ) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17". Inicialmente foi desenhado um (DCC) para avaliar os efeitos combinados das variáveis: velocidade de agitação (rpm) e concentração de FG-10 (%), sobre o  $k_{La}$  e atividade lipolítica.

O FG-10 e a velocidade de agitação interferiram significativamente no  $k_{La}$ . Os valores ótimos de  $k_{La}$  foram obtidos na faixa de 10-17% de FG-10 e 700-800 rpm de velocidade de agitação, aumentando 3,7 vezes o  $k_{La}$ . Elibol (1999) demonstrou que o uso de 15% de PFC em culturas de *S. coelicor* aumentou 2,5 vezes o  $k_{La}$ .

A atividade lipolítica foi 2,5 vezes maior no meio contendo FG-10, comparado com o meio sem o carreador. A ótima concentração de FG-10 e velocidade de agitação para a validação do modelo foi de 11,2% e 527 rpm, respectivamente. Nesta condição, a máxima produção de célula foi de 8,4 g/L e a atividade lipolítica foi de 861 U/L, após 6 h de cultivo. Nos cultivos realizados sem PDMS, o pico máximo de produção de lipase foi em 12 h. A redução pela metade do tempo de produtividade, pode ser atribuído ao metabolismo aeróbio da cepa de *S. warneri* EX17 e a melhor disponibilidade de oxigênio.

Dey et al. (2004) usaram 0,1% de PDMS não emulsificado, em culturas de *S. coelicor* para a produção de antibióticos e observaram um aumento de 3 vezes. Elibol e Ozer (2000) mostraram que o uso de 10% de PFC em meio de cultura para a produção de lipases pelo fungo *Rhizopus arrhizus* aumentou 8,5 vezes a produção desta enzima. Amaral et al. (2007) investigaram o uso de 20% de PFC na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* e observaram um aumento de 23 vezes na produção.

Estudos presentes na literatura, que investigam a produção de lipases, demonstram que o uso de PFC comparado ao PDMS é mais eficiente no fator produtividade. Mas, o PDMS alia a vantagem de ter um custo menor.

Investigou-se ainda o uso de dois tipos de PDMS, fluido e emulsificado, os dois demonstraram serem eficientes carreadores de oxigênio. A produção de lipases demanda o suprimento constante de oxigênio, a adição de um carreador de oxigênio barato foi uma alternativa para a melhoria do processo.

O uso de ferramentas estatísticas proporcionou um aumento da atividade enzimática e possibilitou a predição dos valores ótimos, das variáveis estudadas. Isso é muito importante em bioprocessos, pois possibilita o aumento de escala da bancada para a indústria.

Os resultados obtidos, também apontam a viabilidade da utilização de um subproduto abundante (glicerol residual gerado na síntese química de biodiesel) para a produção de uma enzima de alto valor agregado. Este resultado é importante do ponto de vista econômico, no que diz respeito a processos biotecnológicos, além de apresentar efeitos positivos do ponto de vista ambiental. É importante ressaltar que o uso de carreadores de oxigênio baratos, aliado a uma fonte de carbono abundante como o glicerol é um caminho viável para o desenvolvimento da biotecnologia.

## PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu o estudo da produção em cultivos submersos de lipases por *S. warneri* EX17, usando glicerol residual como substrato e carreadores de oxigênio. Os resultados obtidos demonstraram o potencial do uso de PDMS como carreadores de oxigênio, portanto novas explorações acerca destes merecem serem realizadas, assim como relacionados à produção da enzima.

Quanto ao uso de PDMS como carreadores de oxigênio:

- Estudar o uso de PDMS com outros microrganismos produtores de lipase, por exemplo, a levedura *Yarrowia lipolytica*.

- Estudar o uso de PDMS com a cepa *S. warneri* EX17 na produção em cultivo submerso através de batelada alimentada.

Quanto à enzima produzida:

- Estudar a hidrólise de substratos importantes na química farmacêutica, na indústria de alimentos e indústria química.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, F.O.M. (2001). **Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682), Dissertação (Mestre em Ciências), Departamento de Fármacos – Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- AMARAL, P.F.F.; ALMEIDA, A.P.; PEIXOTO, T.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 339-344, 2007.
- ATES, S.; OZEMIR, S.; GÖKDERE, M. Effect of silicone oil on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* and *Aspergillus niger*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.42, p. 500- 501, 2006.
- ATHALYE, S. K.; GARCIA, R.A.; WEN, Z. Use of Biodiesel-Derived Crude Glycerol for Producing Eicosapentaenoic Acid (EPA) by the Fungus *Pythium irregulare*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 2739–2744, 2009.
- BEREKAA, ZAGHLOUL, T. I.; ABDEL- FATTAH, H. M.; SAEED, H. M.; SIFOUR, M. Production of a novel glycerol- inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 25, p. 287-294, 2009.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and Enzyme Technology**, Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.
- CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.
- CHEN, J.Y.; WEN, C.M.; CHEN, T.L. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p.311-316, 1999.
- CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, H.J.; YANG, M.D.; XU, J.M. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumonia*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 740-744, 2007.
- CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U.J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 143-153, 2002.
- DAMIANO, D., e WANG, S.S. Novel use of a perfluorocarbon for supplying oxygen to aerobic submerged cultures. **Biotechnology Letters**, v.7, p.81-86, 1985.

DE MARÍA, P. D.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p.180– 196, 2006.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 1-52, 1994.

DEY, E. S.; NORRLÖW, Y. LIU. Artificial carrier for oxygen supply in biological systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 187-191, 2004.

DILLIS, S.S.; APPERSON, A.; SCHMIDT, M.R.; SAIER, M.H. Carbohydrate transport in bacteria. **Microbiology Reviews**, v.44, p.385-418, 1980.

DOMINGUEZ, A., COSTAS, M., LONGO, M. A., & SANROMAN, A. Anovel application of solid state culture: Production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnological Letters**, v.25, p.1225–1229, 2003.

ELIBOL, M. Response surface methodological approach for inclusion of perfluorocarbon in actinorhodin fermentation medium. **Process Biochemistry**, v.38, p. 667-673, 2002.

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

ELIBOL, M. Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68. **Process Biochemistry**, v.34, p. 557-561, 1999.

Elibol M. Culture of yeast in a perfluorocarbon/water system. **Biotechnology Technology**, v.11, p. 593–596, 1997.

ELIBOL, M., e MAVITUNA, F. Use of perfluorocarbon for oxygen supply to immobilized *Streptomyces coelicolor* A3 (2), **Process Biochemistry**, v.31, p. 507-512, 1996.

ELIBOL M, MAVITUNA F. Effect of perfluorodecalin as an oxygen carrier on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p.206–210, 1995.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A.G.; BACKVALL, J.E.; MOWBRAY, S.L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**,v. 376, p. 109-119, 2008.

FANG, Y.; LU, Z.; LV, F.; BIE, X.; LIU, S.; DING, Z.; XU, W. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. **Current Microbiology**,v. 53, p. 510-515, 2006.

FICKERS, P; FUDALEJ, F.; NICAUD, J.; FICKERS, P; DESTAIN, J; THONART, P. Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p.379–386, 2005.



FICKERS, P; DESTAIN, J; THONART, P. Lipases are atypical hydrolases: Principal characteristics and applications. **Biotechnologie Agronomie Societe et Environnement**, v. 12 p. 119-130, 2008.

GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004.

GANCEDO, C; GANCEDO, J.M; SOLS, A. Glycerol Metabolism in Yeasts. **European Journal of Biochemistry**, v.6, n.2, p.165-172, 1968.

GORDILHO, M.A.; MONTESINOS, J.L.; CASAS, C.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 93, p. 131-142, 1998.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 149-155, 2000.

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

GUPTA, N.; MEHRA, G.; GUPTA, R. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 361-368, 2004a.

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

HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HAUGE, J.G.; KING, T.E.; CHELDELIN, V.H. Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*. **Journal of Biological Chemistry**, v.214, p.11-16, 1955.

HEMACHANDER, C.; BOSE, N.; PUVANAKRISHNAN, R. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 629-633, 2001.

HILAL, N.; KOCHCODAN, V.; NIGMATULLIN, R.; GONCHARUK, V.; AL- KHATIB, L. Lipase- immobilized biocatalytic membranes for enzymatic esterification: Comparison of various approaches to membrane preparation. **Journal of Membrane Science**, v.268, p.198-207, 2006.

HORSHANI, H.; MOSBAH,H.; SALEM,N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.56, p. 237-245, 2009.

HYUK, J.W.; KIM, H.K.; LEE, C.Y.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 25-30, 2002.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265, 2005.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, v.102 , p. 45-53, 2003.

JESUS, M. F. C. P.; BRANCO, R. N. ; SANT'ANA, J. R.; G. L., FREIRE, D. M. G.; SILVA, J. R., J. G.; *Penicillium restrictum* lipases: a comparative study and characterization of enzyme with different degrees of purity. **Brasilian journal of Chemical Engineering**, v.16, 1999.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; KUMAR, P.A. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 52, p. 315–320, 2006.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v.26 , p.457–470, 2008.

JUNKER, B.H., HATTON, T.A. e WANG, D.I.C. Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. Experimental observations. **Biotechnol. Bioeng.**, v.35, p.578-585, 1990.

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

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for Synthesis of Lipase with *Enterobacter aerogenes*. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.52, p. 1349-1356 , 2009.

LOWE, K. C. Perfluorochemical respiratory gas carriers: benefits to cell culture systems, **Journal Fluorine Chemistry**, v. 118, p.19-26, 2002.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v.14, p. 98-105, 1996.

LEVINSON, W.E.; KURTZMAN, C.P.; KUO, T.M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 292–295, 2007.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.

LI, C.; CHEN, S.; CHENG, C.; CHEN, T. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. **Biochemical Engineering Journal**, v.25, p.195–199, 2005.

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

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M.; MORAIS, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

MENDES A. A.; CASTRO H. F.; PEREIRA, E. B.; FURIGO, A. J. Aplicação de lípases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, 2005.

MONTEIRO, C. L. B. Técnicas de avaliação sensorial. 2.ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1984. 101p.

MONTESINOS, J. L.; DALMAU, E.; CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.78, p.753-761, 2003.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 31–39, 2007.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUIB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 282-291, 2005.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.

MU, Y.; XIU, Z.;ZHANG, D. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumonia*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 537–541, 2008.

OH, B.C.; KIM, H.K.; LEE, J.K.; KANG, S.C.; OH, T.K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 385-392, 1999.

PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; PANAYOTOU, M. G.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass and bioenergy**, v. 32, p.60-71, 2008.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* a potencial producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, p. 737-744, 2002.

PASTORE, G.M.; DA COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n. 2, p. 135-140, 2003.

PEREIRA, Ernandes, Benedito. **Tratamento Enzimático para remoção de gorduras dos resíduos gerados por indústrias de produtos avícolas.** 2004. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química)- Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de santa Catarina. Florianópolis, Santa Catarina, 2004.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A; THANGAVELU, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. **Brasilain Archives of Biology and technology**, v. 52, p. 207-219, 2009.

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

ROBLES, A.; LUCAS, R.; DE CIENFUEGOS, R.; GÁLVES, A. Biomass production and detoxification of the wastewaters from the olive oil industry by strains of *Penicillium* isolated from wastewater disposal ponds. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 217-221, 2000.

RODRIGUES, MI, IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

ROLS, JL, CONDORET, JS, FONADE, C, GOMA, G. Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors, **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p. 427-435, 1990.

RYMOWICZ, W.; RYWINKA, A.; MARCINKIEWICZ, M. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**, v. 31, p.377–380, 2009.

SABOURIN-PROVOST,G.; HALLENBECK, C. P. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. **Bioresource Technology**, v.100, p. 3513–3517, 2009.

SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 239 – 247, 2003.

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

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SUGIHARA, A. e TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SIMONS, J.W.F.A.; van KAMPEN, M.D.; RIEL, S.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R.; VERHEIJ, H.M. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*: Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, p. 675-683, 1998.

SOUZA, C.F.V.; ROSA, T.D.; AYUB, M.A.Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano Cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 260-266, 2003.

TAN, T., ZHANG, M., WANG, B., YING, C. e DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation, **Process Biochemistry**, v.39, p.459-465, 2003.

TALON, R.; MANTEL, M.C.; BERDAGUE, J.L. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 620-622, 1996.

TALON, R.; DUBLET, N.; MONTEL, M.C.; CANTONNET, M. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. **Current Microbiology**, v. 30, p. 11-16, 1995.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA, M.I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637-641, 2002.

VAN KAMPEN, M.D.; ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1544, p. 229-241, 2001.

VOIT, H.; WENZIG, E.; MERSMANN, A.B. Production of a microbial lipase by *Staphylococcus carnosus* (pLipMut 2) in a bubble column reactor and a centrifugal field bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 221-226, 1991.

VOLPATO G, RODRIGUES RC, HECK JX, AYUB MAZ. Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 14, p.105-111, 2009.

VOLPATO G, RODRIGUES RC, HECK JX, AYUB MAZ. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. **J Chem Technol Biotechnol**, v.83, p.821-828, 2008.

WILLKE, T.; VORLOP, K. Biotransformation of glycerol into 1,3- propanediol. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, n° 9, p. 831-840, 2008.

XIU, Z-L.; CHEN, X.; SUN, Y-Q.; ZHANG, D-J. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumonia* under microaerobic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 33, p. 42-45, 2007.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91-96, 2007.