

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CULTIVO NA
PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Staphylococcus warneri* EX17 E
PROPRIEDADES DESTA ENZIMA APÓS IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTES
HIDROFÓBICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LÍGIA DE ABREU

PORTO ALEGRE - RS, BRASIL
ABRIL - 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE CULTIVO NA
PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Staphylococcus warneri* EX17 E
PROPRIEDADES DESTA ENZIMA APÓS IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTES
HIDROFÓBICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LÍGIA DE ABREU
(OCEANÓLOGA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

PORTO ALEGRE - RS, BRASIL
ABRIL – 2013

CIP - Catalogação na Publicação

Abreu, Lígia de
Influência de diferentes estratégias de cultivo
na produção de lipases por *Staphylococcus warneri*
EX17 e propriedades desta enzima após imobilização em
suportes hidrofóbicos / Lígia de Abreu. -- 2013.
69 f.

Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.
Coorientadora: Giandra Volpato.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Lipases. 2. Imobilização de enzimas. 3.
Staphylococcus warneri EX17. I. Ayub, Marco Antônio
Zachia, orient. II. Volpato, Giandra, coorient. III.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

“A uma mulher foi concedida a permissão de ver tanto o céu quanto o inferno, ainda em vida. Para sua grande surpresa, descobriu que o inferno era uma imensa reunião de pessoas em um banquete que se perdia de vista. Contudo, as vozes das pessoas eram uma cacofonia de lamentações e queixumes angustiados. À medida que se acostumava com o alarido e com o quadro diante de seus olhos, ela notou que os talheres e demais utensílios de mesa eram tão compridos que, tentassem as pessoas o quanto pudessem, não eram capazes de trazer comida até a boca. E se tentassem pegar o alimento com as mãos, estes sumiam por entre seus dedos. Ela então compreendeu porque aquilo era o inferno: somente a abundância não trazia nenhum bem para as pessoas.

Com um misto de tristeza e esperança, ela então se dirigiu para o céu e se deparou com a mesma cena; fileiras de mesas repletas de deliciosos pratos e os mesmos talheres compridos. No entanto, ela notou duas coisas diferentes: ninguém tentava pegar a comida com as mãos e não havia gemidos nem lamúrias. Ao contrário, todos riam e se regozijavam, divertindo-se a valer. Ali, as pessoas davam de comer umas às outras.” (LUX, 1993, p. 133).

A meu ver, esta estória reflete aspectos de um grupo de aprendizagem. Foi assim, “dando de comer umas às outras”, que este projeto se concretizou. Obrigada a toda equipe do Bioteclab, por me ajudar das mais diversas maneiras. Agradeço à Capes e à Pró-reitoria de Pós-graduação pelo apoio financeiro.

Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipases por *Staphylococcus warneri* EX17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicos.¹

Autor: Lígia de Abreu

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientador: Dr^a. Giandra Volpato

RESUMO

Enzimas microbianas, quando produzidas a um custo acessível e preservadas suas propriedades catalíticas, são ferramentas determinantes para a sustentabilidade das indústrias química e energética. Buscando aprimorar a produção de lipases pela cepa de *Staphylococcus warneri* EX17, diferentes estratégias de cultivo em biorreatores submersos foram aplicadas para analisar a influência de algumas variáveis na produção da enzima e então foi proposto o cultivo em batelada alimentada. Paralelamente, lipases de *S. warneri* EX17 (SWL) foram imobilizadas por adsorção hidrofóbica em Octyl-Sepharose, Immobead 150 e MCI GEL CHP20P. Os resultados indicaram que a interação entre enzima e suporte interfere nas propriedades da enzima imobilizada. Os preparados Octyl-SWL e MCI-SWL preservaram sua atividade lipolítica quando expostos a 50 % (v/v) de Butanol, Etanol, *n*-Hexano, Isopropanol e Metanol. Na síntese do éster aromático butirato de etila, Octyl-SWL e MCI-SWL exibiram desempenho promissor, alcançando em 24 h de reação 28 % e 35,6 % de rendimento, respectivamente. Lipases de *S. warneri* EX17 purificadas e imobilizadas em suportes hidrofóbicos preservaram propriedades que apontam seu potencial como biocatalisador industrial.

1. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (57 p.). Abril, 2013.

Influence of different cultivation strategies on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 and properties of this enzyme after immobilization on hydrophobic supports.¹

Author: Lígia de Abreu

Supervisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-supervisor: Dr^a. Giandra Volpato

ABSTRACT

Microbial enzymes, when produced at affordable costs and preserving their catalytic properties, are crucial tools for sustainable chemical and energy industries. To enhance lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 strain, different cultivation strategies were applied to investigate the influence of some variables on enzyme production and then fed-batch cultivation was proposed. Additionally, three hydrophobic supports, Octyl-Sepharose, Immobead 150 and MCI GEL CHP20P have been assayed to purify and immobilize the lipase from *S. warneri* EX17 (SWL) via interfacial adsorption. Results indicated that the intensity of the interaction between the lipase and the support surface interferes in properties of the immobilized enzyme. The immobilized preparations Octyl-SWL and MCI-SWL preserved their lipolytic activity in the presence of 50 % (v/v) Butanol, Ethanol, n-Hexane, Isopropanol and Methanol. Octyl-SWL and MCI-SWL catalyzed the ester synthesis reaction giving 28 % and 35.6 % of conversion in 24 h. These enzyme preparations may be promising alternatives as industrial biocatalysts.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (57 p.). April, 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Biocatálise	3
2.2. Lipases	4
2.3. Aplicações das lipases.....	6
2.4. Microrganismos produtores de lipases	7
2.5. Condições de cultivo para produção de lipases.....	8
2.6. Utilização do glicerol como substrato.....	11
2.7. Cultivos submersos.....	12
2.8. Purificação enzimática	14
2.9. Imobilização de enzimas.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Microrganismo e manutenção da linhagem microbiana.....	18
3.2. Meios de cultivo	18
3.3. Glicerol.....	19
3.4. Preparação do inóculo	19
3.5. Cultivo em biorreatores.....	20
3.5.1. Processos em batelada.....	20
3.5.2. Processos em batelada alimentada	21
3.6. Determinação da biomassa	22
3.7. Determinação da atividade lipolítica	22
3.8. Determinação de proteína solúvel	23
3.9. Determinação do glicerol	23
3.10. Clarificação do extrato enzimático	23
3.11. Adsorção a suportes hidrofóbicos.....	24

3.12.	Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	24
3.13.	Estabilidade térmica da enzima imobilizada	25
3.14.	Efeito de solventes na atividade lipolítica	25
3.15.	Síntese de butirato de etila	25
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1.	Avaliação das diferentes estratégias de cultivo adotadas para produção de lipases	27
4.1.1.	Cultivos em batelada.....	27
4.1.2.	Batelada alimentada	32
4.2.	Purificação e Imobilização	35
4.3.	Estabilidade térmica da enzima imobilizada	38
4.4.	Efeito de solventes na atividade lipolítica	40
4.5.	Síntese de butirato de etila	42
5.	CONCLUSÕES	45
6.	PERSPECTIVAS	47
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas.....	5
Figura 2. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento a (otimizado).....	27
Figura 3. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento b (sem óleo)..	29
Figura 4. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento c (sem FG-10).	31
Figura 5. Efeito da concentração do inóculo no crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol.	32
Figura 6. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol no cultivo em batelada alimentada.....	34
Figura 7. Curva de imobilização da lipase nos diferentes suportes.	36
Figura 8. Eletroforese das enzimas imobilizadas nos diferentes suportes.	38
Figura 9. Estabilidade térmica dos diferentes preparados enzimáticos de SWL.	40
Figura 10. Síntese de butirato de etila por preparados enzimáticos de SWL....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do glicerol residual.	19
Tabela 2. Efeito de solventes na estabilidade dos preparados enzimáticos de SWL.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

DO	Densidade ótica
FG-10	Emulsão antiespumante (Dow Corning [®])
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
kDa	Quilodalton
$k_L a$	Coefficiente volumétrico de transferência de massa
LB	Meio Luria-Bertani
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFC	Perfluorocarbono
<i>p</i> NPP	<i>p</i> -Nitrofenil Palmitato
SWL	Lipase produzida por <i>Staphylococcus warneri</i> EX17

1. INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas que apresentam propriedades que sugerem ampla aplicação industrial. Embora certo número de lipases esteja comercialmente disponível, o alto custo de produção destas enzimas e a dificuldade em manter sua atividade, especificidade e estabilidade faz com que o uso destes biocatalizadores seja restrito. Este trabalho explora aspectos que podem contribuir para a difusão do uso de lipases no setor produtivo.

Dentre as enzimas com aplicabilidade industrial, as lipases microbianas constituem um grupo importante, por serem estáveis na presença de solventes orgânicos, terem alta especificidade pelo substrato, não requerem a presença de cofator e exibem grande enantiosseletividade (JAEGER & REETZ, 1998). Estas enzimas são biocatalizadores versáteis capazes de atuar em diferentes reações, tanto em meio aquoso como em meio orgânico com teor de água restrito (CARVALHO et al., 2005). As lipases podem ser de origem animal, vegetal ou produzidas por microrganismos, sendo estas últimas as mais utilizadas na indústria de alimentos, de detergentes, oleoquímica e na obtenção de insumos farmacêuticos (GUPTA et al., 2004).

Novos avanços em biocatálise são determinantes para a redução do impacto ambiental causado pela indústria química e energética. A produção de biocombustíveis, por exemplo, já alcançou grande magnitude e é projetada para aumentar ainda mais (SABOURIN-PROVOST & HALLENBECK, 2009),

porém gera grandes quantidades de resíduo com diversas impurezas. A conversão destes resíduos, como o glicerol oriundo da síntese de biodiesel, em produtos de valor agregado é de grande interesse, sendo a sua utilização como substrato para a produção de enzimas uma alternativa bastante promissora (LEVINSON et al., 2007). Adicionalmente, o emprego de lipases como catalisador na produção de biocombustíveis gera subprodutos mais limpos e torna este processo efetivamente sustentável.

As propriedades exibidas pelas lipases tornam sua aplicação biotecnológica interessante; por motivos práticos e econômicos, é vantajoso fazer uso da enzima na sua forma imobilizada (MENDES et al., 2011). Visando desonerar a produção de lipases, o desenvolvimento de técnicas que aumentem a eficiência dos processos de purificação e imobilização mostra-se bastante pertinente.

Considerando que microrganismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completa ou parcialmente diferenciadas, a exploração de novos microrganismos produtores de lipases permanece em foco no meio científico. Por este motivo, o presente estudo teve como objetivo aprimorar a produção de lipases pela cepa de *Staphylococcus warneri* EX17, bem como testar a eficiência de purificação e imobilização desta enzima em diferentes suportes hidrofóbicos. Nesse contexto, os objetivos específicos foram: avaliar a influência de diferentes estratégias de cultivo na produção da enzima; testar a produção de lipases em sistema de cultivo batelada alimentada; estudar a estabilidade dos preparados enzimáticos; e, investigar a capacidade de síntese da enzima imobilizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biocatálise

A base da biocatálise moderna está no desenvolvimento de ferramentas precisas para melhorar uma ampla gama de processos industriais, reduzindo o consumo de energia e matéria-prima e gerando menos resíduos e subprodutos tóxicos (ALCALDE et al., 2006).

As enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Propriedades como grande eficiência catalítica, elevada especificidade e seletividade, atuação em condições brandas de pressão, temperatura e pH e aceitabilidade ambiental tornam as enzimas excelentes biocatalisadores (BORNSCHEUER, 2005). No entanto, quando aplicadas em processos industriais, muitas enzimas não são suficientemente estáveis nas condições de reação desejadas. Diversos fatores provocam a perda de sua atividade e seletividade ótimas como agitação mecânica, presença de solventes, temperatura elevada, pHs extremos e inibição por altas concentrações de substratos e produtos (KLIBANOV, 1983).

O objetivo de converter as enzimas em ferramentas precisas da biocatálise pode ser alcançado através da diminuição dos custos de produção, da exploração de novos microrganismos produtores, de melhoramentos genéticos que aumentem a expressão da enzima de interesse, da imobilização e estabilização de enzimas.

2.2. Lipases

A existência das lipases foi observada primeiramente no ano de 1901 em *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* e *Bacillus fluorescens* (EIJKMAN, 1901), que representam alguns dos produtores de lipase mais estudados, atualmente conhecidos por *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente (JAEGER et al., 1994).

As lipases são nomeadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3), ou seja, são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis levando, através de uma reação sequencial, a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos (MAHADIK et al., 2002; CASTRO et al., 2004). Constituem o grupo de biocatalizadores mais amplamente utilizados na química orgânica (JAEGER & EGGERT, 2002). Em meio aquoso, as lipases podem ser usadas para hidrolisar reações e, em presença de solventes orgânicos, podem ser usadas para síntese de ésteres (JAHIC et al., 2003).

Uma propriedade característica das lipases é o mecanismo de “ativação interfacial”, que significa um forte aumento observado na atividade da lipase quando o substrato começa dar forma a uma emulsão, desse modo apresentando à enzima uma área interfacial (JAEGER et al., 1994). O fenômeno de ativação interfacial está relacionado com a estrutura tridimensional da enzima e o seu mecanismo de ação (Figura 1). As lipases contêm um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou borda (*lid*), que cobre a entrada do sítio ativo. Quando o substrato liga-se à superfície da

enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada e inativa da enzima para a forma aberta e ativa, 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). Esta grande superfície hidrofóbica apresentada pelas lipases quando estão em sua forma aberta faz com que estas enzimas tenham uma grande afinidade por outras superfícies hidrofóbicas, o que favorece a técnica de imobilização por adsorção de lipases em suportes hidrofóbicos (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

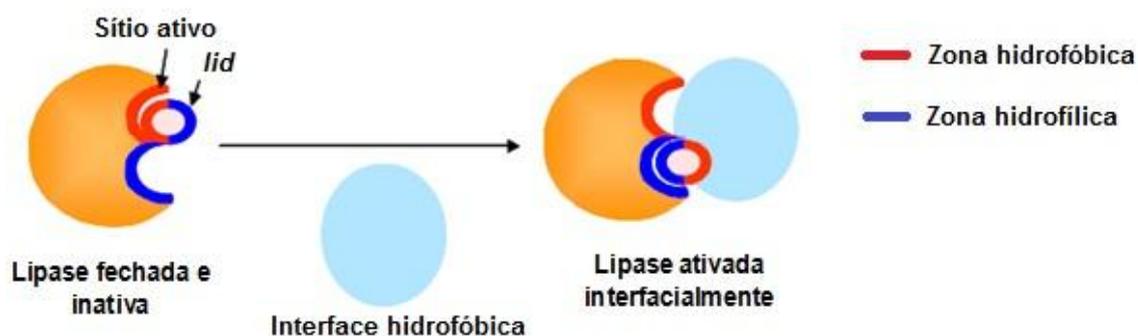


Figura 1. Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas (RODRIGUES, 2009).

Outros fatores que influenciam a atividade das lipases são temperatura e pH, sendo que valores ótimos de atuação para estas enzimas variam de acordo com a origem das mesmas (VAN KAMPEM et al., 2001; HORSHANI et al., 2009). Geralmente, as lipases produzidas por microrganismos são mais estáveis (CASTRO et al., 2004) e encontram grande aplicabilidade em indústrias de alimentos, detergentes, tratamentos de efluentes entre outras (VAN KAMPEM et al., 2001; JAHIC et al., 2003; KUMAR et al., 2005; HORSHANI et al., 2009). Essa preferência pelas lipases

microbianas está relacionada a propriedades como especificidade, estabilidade, temperatura e pH de atuação favoráveis para processos industriais e habilidade para catalisar reações de síntese na presença de solventes orgânicos (JAEGER & EGGERT, 2002).

Vários artigos envolvendo produção de lipases por microrganismos têm sido publicados, demonstrando maior eficiência dos processos de produção e avanços na biologia molecular. Estes resultados contribuem para a obtenção de lipases com atividade elevada a um custo mais acessível (HASAN et al., 2006).

2.3. Aplicações das lipases

Atributos como alta conversão de substrato em produto, facilidade de manipulação genética, rápido crescimento do microrganismo produtor, utilização de meios de cultivos baratos e finalmente, produção de enzimas extracelulares de fácil obtenção tornam as lipases microbianas ainda mais interessantes para aplicações industriais (SHARMA et al., 2001; HORSHANI et al., 2009).

Em virtude das propriedades apresentadas, as lipases são consideradas o grupo mais importante de biocatalisadores. Suas aplicações biotecnológicas envolvem síntese orgânica, indústria de alimentos, detergentes, óleos e gorduras, fármacos, tratamento de efluentes, síntese de biodiesel, oleoquímica, cosméticos e perfumes, entre outros processos industriais (SHARMA et al., 2001; HORSHANI et al., 2009). Dentre os diversos setores de aplicação das lipases, destaca-se a indústria de alimentos. Estas

enzimas têm sido utilizadas para a obtenção de ácidos graxos livres a partir da hidrólise seletiva de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Estes ácidos graxos podem conferir um peculiar sabor e aroma aos alimentos, muitas vezes alterando as propriedades físico-químicas, sensoriais e nutricionais de diversos produtos (JAEGER & REETZ, 1998).

Também se encontram em evidência reações de síntese de ésteres usando catálise enzimática. Lipases com capacidade de catalisar reações de transesterificação em presença de solventes orgânicos são consideradas como um importante biocatalisador para produção de biodiesel (JAEGER & EGGERT, 2002). Ademais, a síntese enzimática de ésteres aromáticos de cadeia curta com aroma frutado é amplamente empregada em indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

2.4. Microrganismos produtores de lipases

O estudo realizado por Sharma et al. (2001) listou 109 diferentes espécies de microrganismos produtores de lipases. Dentre estas espécies, 47 representam bactérias, destacando-se os gêneros *Bacillus* (15) e *Pseudomonas* (12), 42 são fungos filamentosos e 20 são leveduras. Entre as leveduras produtoras de lipases destacam-se: *Yarrowia lipolytica* (FICKERS et al., 2005; AMARAL et al., 2007), *Candida antarctica* (ERICSSON et al., 2008) e *Candida rugosa* (DE MARÍA et al., 2006). Os fungos filamentosos mais citados na literatura como produtores de lipases pertencem aos gêneros *Aspergillus* (MAHADICK et al., 2002), *Rhizopus* (PASTORE et al., 2003) e *Penicillium* (SAXENA et al., 2003a).

No grupo das bactérias, além dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, vários autores reportam a produção de lipases como sendo uma propriedade geral do gênero *Staphylococcus*. Dentro deste gênero, destacam-se as espécies: *S. xylosus* (MOSBAH et al., 2005), *S. saprophyticus* (FANG et al., 2006), *S. aureus* (HYUK et al., 2002), *S. haemolyticus* (OH et al., 1999), *S. carnosus* (VOIT et al., 1991), *S. epidemidis* (SIMONS et al., 1998) e *S. warneri* (TALON et al., 1995; VAN KAMPEN et al., 2001).

Existem poucos estudos publicados sobre lipases de *S. warneri*. Talon et al. (1995) demonstraram que a produção da lipase (SWL1) estava relacionada com as fases de crescimento do microrganismo. Van Kampen et al. (2001) estudaram a produção de uma lipase de *S. warneri* 863 a partir da clonagem da mesma em *E. coli*, esta lipase foi nomeada como SWL2. Estudos sobre o efeito da taxa de transferência de oxigênio e do pH na produção de lipases por *Staphylococcus warneri* EX17 foram realizados por Volpato et al. (2009a). Testes com adição de silicone emulsificado ao meio de cultivo e diferentes condições de k_La foram estudados por Rech et al. (2012) para otimizar a produção de lipase por *S. warneri* EX17 em biorreatores.

2.5. Condições de cultivo para produção de lipases

Com a necessidade de reduzir custos e aumentar a produção de lipases microbianas, estudos têm sido realizados para definir condições ótimas de cultivo e exigências nutricionais dos microrganismos para a produção destas enzimas em culturas submersas. A produção de lipases microbianas é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pelo pH da cultura, temperatura de crescimento e pela concentração de oxigênio

dissolvido (GUPTA et al., 2004). Por serem enzimas induzíveis (LOTTI et al., 1998), a presença de fontes lipídicas no meio de cultura, como óleos, triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais biliares ou glicerol torna-se de grande importância para sua produção (RATHI et al., 2001).

Gordilho et al. (1998) consideraram o óleo de oliva o melhor indutor para produção de lipase devido a alta quantidade de ácido oléico presente neste óleo. Montesinos et al. (2003) estudaram a produção de lipases intra e extracelulares pela levedura *Candida rugosa* em sistemas de cultivo submerso batelada e batelada alimentada e concluíram que o melhor rendimento da lipase foi obtido usando uma única fonte de carbono, o ácido oleico, em cultivo batelada alimentada.

Lin et al. (2006) investigaram a influência de diferentes condições nutricionais e físico-químicas para a produção de lipases por *Antrodia cinnamomea* em cultivos submersos e observaram maior atividade lipolítica ($54 \text{ mU} \cdot \text{mL}^{-1}$) utilizando meio de cultivo contendo glicerol, NaNO_3 , tiamina, pH inicial de 5,5 e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Em outro trabalho, Maia et al. (2001) avaliaram o efeito das condições de cultivo na produção de lipases por *Fusarium solani* em sistemas de cultivo batelada e 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.

Muitos outros estudos foram realizados com o objetivo de otimizar meios de cultivo para produção de lipases (GULATI et al., 2000; HEMACHANDER et al., 2001; TAN et al., 2003; BURKERT et al., 2004; LI et al., 2005). Outro parâmetro muito importante neste campo é a concentração de

oxigênio disponível. A inadequada provisão de oxigênio é um fator crítico para cultivos aeróbios em meios submersos, pois o oxigênio disponível dentro do meio de cultivo constitui um fator decisivo para o crescimento de microrganismos. Com isso, estudos que avaliaram diferentes taxas deste parâmetro observaram um aumento na produtividade de lipases em sistemas com alta transferência de oxigênio (ELIBOL & ÖZER, 2000a; AMARAL et al., 2007). Para aumentar o oxigênio dissolvido no meio de cultura, Amaral et al. (2007) utilizaram perfluorocarbono (PFC) na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*. PFCs são compostos completamente inertes, derivados de hidrocarbonetos, formados pela substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor que podem ser usados como carreadores de oxigênio em meios de cultura e assim aumentar a disponibilidade desse gás no meio. A solubilidade do oxigênio em PFC é de 10 a 20 vezes maior que em água (LOWE, 2002). Amaral et al. (2007) observaram que a adição de 20 % de PFC ao meio de cultivo aumentou a produtividade da enzima em até 23 vezes quando comparado ao controle sem PFC.

O polidimetilsiloxano (PDMS) é um composto quimicamente estável, biologicamente seguro, de fácil manipulação, barato e muito usado para fornecer oxigênio em reações enzimáticas (WANG et al., 2002). Considerando essas propriedades e o fato de que a solubilidade do oxigênio em polímeros de PDMS é de 45 a 50 vezes maior que na água, este produto tem sido testado em cultivos microbianos. Resultados obtidos por Rech et al. (2012) revelaram o efeito positivo da adição de PDMS emulsificado, um antiespumante comercialmente denominado FG-10, no coeficiente de transferência de

oxigênio (k_{La}) durante a otimização da produção de lipases por *S. warneri* EX17 em biorreatores operados em batelada.

2.6. Utilização do glicerol como substrato

O glicerol constitui uma promissora e abundante fonte de carbono para a microbiologia industrial, uma vez que ele se tornará um subproduto excedente com a produção de biodiesel em larga escala comercial (PAPANIKOLAU et al., 2002; LEVINSON et al., 2007). Muitos estudos têm como objetivo a conversão microbiológica de glicerol em produtos de valor agregado a partir da sua utilização como fonte de carbono para o crescimento celular.

A utilização de glicerol residual oriundo da síntese de biodiesel para produção de ácido cítrico inicia-se no trabalho de Papanikolau et al. (2002). Os autores demonstraram que o glicerol residual com 60 % de pureza é um substrato adequado para produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. Desde então, vários estudos envolvendo o uso de glicerol residual como substrato foram publicados. Ito et al. (2005) estudaram a produção de hidrogênio e etanol por *Enterobacter aerogenes* HU-101 utilizando glicerol presente no efluente da síntese de biodiesel com 41 % de pureza e conseguiram um elevado rendimento e uma alta taxa de produção do bioproduto desejado. Mu et al. (2008) e Wilke & Vorlop (2008) utilizaram glicerol oriundo da síntese de biodiesel para produzir 1,3-propanodiol.

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 eritritol. Sabourin-Provost & Hallenbeck (2009) usaram a bactéria *Rhodopseudomonas palustris* para conversão de glicerol puro e residual em hidrogênio. Athalaye et al. (2009) usaram o fungo *Pythium irregulare* para converter glicerol em ácido eicosapentaenóico (EPA).

Vários são os estudos que relatam a utilização do glicerol puro e residual para a obtenção de alguns bioprodutos, porém o ramo da produção de enzimas utilizando glicerol como fonte de carbono para o microrganismo produtor ainda pode ser bastante explorado. Na linha deste trabalho, que visa à produção microbiana de lipases utilizando glicerol residual oriundo da síntese de biodiesel como substrato, há poucos estudos na literatura. Pode-se citar os trabalhos de Gupta et al. (2004), Lin et al. (2006), Volpato et al. (2008) e Rech et al. (2012).

2.7. Cultivos submersos

Os cultivos submersos são definidos como aqueles em que a célula produtora se desenvolve no interior do meio de cultivo, com agitação. Eles podem ser realizados em frascos dispostos em incubadora rotatória, biorreatores de bancada ou biorreatores de escala industrial. Estes sistemas 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 procedimento transcorre sem adição ou retirada do meio de cultivo reacional. Outra forma é o cultivo em batelada alimentada, que consiste em alimentar 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 estratégia de cultivo melhor definida para produção de lipases é a de cultivo submerso (YANG et al., 2005). A escolha do sistema de cultivo e o modelo do biorreator são fatores chave para a produção de lipases porque interferem na taxa de transferência de oxigênio (GALACTION et al., 2004). Os valores de k_{La} são afetados por vários fatores como: as características geométricas e operacionais dos biorreatores, composição do meio de cultivo e concentração e morfologia do microrganismo (CHISTI & JAUREGUI-HAZA, 2002).

Para a produção de enzimas extracelulares os processos descontínuos são os mais utilizados. Montesinos et al. (2003) utilizaram *Candida rugosa* em sistema batelada e batelada alimentada para produção de lipases e concluíram que o emprego do sistema batelada alimentada aumentou em 50 % a produtividade da enzima, em comparação ao cultivo em batelada. Tamerler & Keshavarz (2000) também observaram que o cultivo em batelada alimentada aumentou a produção enzimática por *Ophisosloma piceaae*. Li et al. (2005) utilizaram o sistema de cultivo batelada alimentada para produzir lipases de *Acinotebacter radioresistents*.

Além de maior produção enzimática, cultivos em batelada alimentada apresentam vantagens como o desenvolvimento rápido do cultivo, alta concentração de produto, potencial flexibilidade de produção, processo de validação rápido e simples e controle da repressão catabólica (HENES & SONNLEITNER, 2007).

2.8. Purificação enzimática

As etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e desenvolvimento da etapa de cultivo, pois, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, não há processos de purificação de aplicação geral (PESSOA JR & KILIKIAN, 2005).

As enzimas comerciais apresentam-se desde preparações enzimáticas brutas até enzimas altamente purificadas (BON et al., 2008). A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de menores quantidades da enzima. No entanto, deve-se levar em consideração a aplicação final de cada preparado enzimático, pois quanto maior o número de operações unitárias de separação e recuperação, maiores serão os custos e a perda de atividade enzimática.

No caso das lipases microbianas, geralmente as enzimas são extracelulares e o período de cultivo é seguido pela remoção das células do meio de cultura. Então as enzimas do meio livre de células podem ser purificadas por etapa única como a cromatografia de afinidade ou por uma combinação de várias etapas como a precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, entre outras. Saxena et al. (2003b) realizaram um estudo sobre os métodos de purificação e verificaram que cerca de 80 % dos sistemas de purificação utilizam uma etapa de precipitação seguida pela combinação de alguns métodos cromatográficos. Estes autores verificaram que entre os métodos cromatográficos, a cromatografia de troca iônica é o mais utilizado (67 %), sendo os grupos dietilaminoetil (DEAE) mais empregado para

troca aniônica (58 %) e carboximetil (CM) para troca catiônica (20 %). O segundo método mais utilizado é a filtração em gel, seguida pela cromatografia de afinidade.

Bastida et al. (1998) sugerem que o mecanismo de ativação interfacial característico das lipases pode ser usado como ferramenta para desenvolver métodos mais simples de purificação e imobilização em um único passo. O uso de suportes hidrofóbicos para imobilização de lipases em meios de baixa força iônica tem sido sugerido como uma forma simples de obter a conformação aberta e estável da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

2.9. Imobilização de enzimas

No ramo da biotecnologia aplicada, a principal razão para imobilizar enzimas é a capacidade de isolar o biocatalisador do produto da reação e reutilizá-lo em novos processos, com o objetivo de aumentar a produtividade. Portanto, a imobilização só é um processo adequado quando a estabilidade final do preparado enzimático é alta o suficiente para permitir este reuso (MATEO et al., 2007).

As propriedades dos derivados enzimáticos (enzima imobilizada) são determinadas tanto pelas características da enzima como pelas do suporte em que se imobiliza. A interação entre os dois irá resultar em um derivado enzimático com propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER & KASCHE, 1999).

Os métodos para imobilização de enzimas podem ser classificados em duas categorias básicas: imobilização por ligação em suportes e encapsulamento (BUCHHOLZ et al., 2005). A imobilização por ligação em suportes pode ser realizada através da ligação da enzima ao suporte por adsorção, onde a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia tais como interações de Van der Waals (hidrofóbicas), ligações de hidrogênio e iônicas. A imobilização também pode ocorrer por ligação covalente, onde as enzimas são covalentemente ligadas ao suporte através de grupos funcionais das enzimas que não são essenciais para a atividade catalítica (D'SOUZA, 1999). Outra técnica de imobilização se dá através de ligação cruzada, onde é realizada a ligação cruzada intermolecular de enzimas por meio de reagentes bifuncionais ou multifuncionais. Os métodos de encapsulamento consistem em “confinar” uma enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana porosa, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos se difundem (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

A adsorção é o método mais comum usado para imobilização devido a sua facilidade e porque possui menor custo. No caso das lipases, sua tendência de adsorver-se a superfícies hidrofóbicas (ativação interfacial) pode ser empregada para desenvolver um protocolo de imobilização específico para estas enzimas (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007), usando como suportes, por exemplo, Octyl-Agarose (BASTIDA et al., 1998). Neste caso, as lipases

“confundem” a superfície do suporte com a superfície hidrofóbica das gotas de óleo, seu substrato natural. Estas enzimas se adsorvem fortemente ao suporte através do *lid* e de sua grande superfície hidrofóbica, que está em torno do sítio ativo, imobilizando-se na sua conformação aberta (PERNAS et al., 2001; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). Este tipo de imobilização permite, em um único passo, a purificação, imobilização e hiperativação das lipases.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo e manutenção da linhagem microbiana

A linhagem de *S. warneri* EX17 foi isolada de efluentes de abatedouros ricos em gordura e identificada por sequenciamento 16S rRNA (VOLPATO et al., 2009a). O microrganismo foi cultivado em meio líquido LB por 12 h a 37 °C e 150 rpm. Essa cultura foi estocada em glicerol na proporção de 80 % de cultura e 20 % de glicerol. A suspensão foi homogeneizada e acondicionada a -18 °C. Adicionalmente, culturas celulares foram mantidas a 4 °C em placas de Petri contendo o meio Ágar Tributirina, sendo essas repicadas ao menos uma vez a cada 30 dias e acompanhadas por microscopia ótica para garantir a pureza das culturas.

3.2. Meios de cultivo

A composição de todos meios de cultivo utilizados neste trabalho está descrita abaixo (em g·L⁻¹):

Luria Bertani (LB): peptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5.

Ágar Tributirina: peptona, 5; extrato de levedura, 3; tributirina neutra, 10; ágar bacteriológico, 15.

Meio Otimizado (VOLPATO et al., 2008): peptona, 10; extrato de levedura, 5; glicerol, 30; óleo de soja, 5; óleo de oliva, 6.

Meio de Alimentação: peptona, 10; extrato de levedura, 5; glicerol, 72,8.

3.3. Glicerol

Glicerol residual proveniente da síntese de biodiesel foi fornecido por uma indústria de biodiesel de soja (Passo Fundo, Brasil).

A Tabela 1. apresenta a composição do glicerol residual utilizado como fonte de carbono nos cultivos em biorreatores.

Tabela 1. Composição do glicerol residual. Valores baseados na fração mássica aproximada, pH 4,84.

Composição	(%)
Glicerol	80
Cinzas	4,5
NaCl	4,9
Monoacilgliceróis	0,5
Água	10,1

3.4. Preparação do inóculo

O pré-inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio LB e inoculado com uma alçada da cultura estoque mantida em placa de Petri com ágar tributirina. O cultivo permaneceu em incubadora orbital rotatória a 150 rpm e 37 °C por 12 h. Posteriormente, nas mesmas condições de cultivo, 2 mL do pré-inóculo foram inoculados em 150 mL de meio LB em frasco Erlenmeyer de 500 mL até apresentar uma DO = 1,0 (absorbância lida em espectrofotômetro a 600 nm), sendo 150 mL desta cultura utilizado como inóculo para o cultivo em biorreator. Quando o crescimento celular superou essa densidade no período de cultivo, a DO do inóculo foi ajustada em 1,0 através da diluição da cultura com o meio de cultivo a ser utilizado no biorreator, mantendo o volume de 150 mL (10 % do volume total do

cultivo). Este procedimento foi mantido na preparação do inóculo dos experimentos realizados em biorreatores.

3.5. Cultivo em biorreatores

Os biorreatores utilizados para a execução dos cultivos submersos foram do modelo Biostat B (B. Braun Biotech, Alemanha), onde os experimentos foram realizados em vasos de 2 L preenchidos com 1,5 L de cultura. Conforme definido por Volpato et al. (2008), a temperatura de operação do biorreator foi controlada em 37 °C, o pH ajustado e mantido a 7,0 e o meio de cultivo base para os experimentos foi o otimizado por esses autores. A esterilização do processo foi feita em autoclave, por 20 min a 121 °C. As variáveis concentração de FG-10 e k_La foram monitoradas de acordo com os resultados obtidos por Rech et al. (2012). Para otimizar a transferência de oxigênio no meio de cultura, foi adicionado o silicone emulsificado (FG-10) na concentração de 11,2 % (v/v), a aeração do biorreator foi de 2 vvm e a agitação de 527 rpm. Amostras foram tomadas ao longo do cultivo para a determinação da biomassa, atividade lipolítica e concentração de glicerol. Diferentes estratégias de cultivo foram aplicadas para analisar a influência de algumas variáveis como a presença de indutores e o efeito da concentração do inóculo na produção de lipases por *S. warneri* EX17. Todos os cultivos em biorreatores foram realizados em duplicata.

3.5.1. Processos em batelada

Os experimentos realizados no sistema de cultivo em batelada foram conduzidos por 24 h e, de acordo com suas particularidades, foram divididos em cinco tratamentos:

- a) Otimizado: As condições de cultivo descritas por Volpato et al. (2008) e por Rech et al. (2012) foram integralmente repetidas a fim de avaliar as condições da cultura estoque e para fins comparativos;
- b) Sem óleo: O meio de cultivo utilizado neste tratamento seguiu a composição do meio otimizado, porém não foram adicionados os óleos de soja e oliva;
- c) Sem FG-10: Foi privada neste tratamento somente a adição do silicone emulsificado FG-10, as demais condições de cultivo permaneceram idênticas às estabelecidas no tratamento otimizado;
- d) [Inóculo] 3x: A composição do meio e as condições de cultivo restantes foram mantidas como no tratamento otimizado, porém a concentração do inóculo foi triplicada. Para tal, 2 L de inóculo foram preparados, as células foram centrifugadas (3000-g por 20 min a 4 °C) e concentradas em 150 mL de meio até que a cultura apresentasse concentração celular 3 vezes maior;
- e) [Inóculo] 6x: Este tratamento seguiu as mesmas condições e procedimentos descritos no item 3.5.1.d, diferenciando-se apenas na etapa de concentração celular do inóculo que se estendeu até que a cultura apresentasse concentração 6 vezes maior.

3.5.2. Processos em batelada alimentada

A análise cinética dos cultivos nos diferentes tratamentos conduziu à elaboração de cultivos em batelada alimentada. Os biorreatores operados no sistema de batelada alimentada foram iniciados com um cultivo em batelada a

fim de permitir o acúmulo e a adaptação celular. A composição do meio inicial foi semelhante ao meio otimizado, diferenciando-se apenas na concentração de glicerol que foi de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A alimentação foi iniciada após 4 h de cultivo e manteve-se com um fluxo constante de $0,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de meio durante 24 h. A concentração de glicerol no meio de alimentação foi calculada de forma a fornecer $0,7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de glicerol ao meio. Terminado o período de alimentação, os cultivos foram estendidos por mais 20 h, totalizando 48 h de cultivo.

3.6. Determinação da biomassa

A biomassa foi quantificada gravimetricamente como peso seco de células. As amostras coletadas ao longo dos cultivos em biorreator foram centrifugadas ($3\ 000\cdot g$ por 20 min a $4\ ^\circ\text{C}$) e lavadas duas vezes com solução alcoólica (20 %) resfriada. Posteriormente, as amostras foram secas a $80\ ^\circ\text{C}$ até atingirem peso constante. O sobrenadante do meio de cultivo livre de células, chamado de extrato enzimático, foi usado para as demais determinações analíticas.

3.7. Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica das amostras foi determinada usando *p*-nitrofenil palmitato (*p*NPP) como substrato (WINKLER & STUCKMANN, 1979). Um volume de 0,15 mL do extrato enzimático bruto foi misturado com 1,35 mL da solução de substrato contendo para 100 mL: 30 mg de *p*NPP diluído em 10 mL de iso-propanol, 400 mg de Triton X-100 e 100 mg de goma arábica diluídos em 90 mL de tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A reação ocorreu a $37\ ^\circ\text{C}$ por 15 min. Um controle negativo contendo a enzima inativada termicamente também

foi incubado. Após o término da reação, as amostras foram centrifugadas (14 000·g por 10 min a 4 °C) e a absorbância medida espectrofotometricamente a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto a 37 °C.

3.8. Determinação de proteína solúvel

A concentração de proteína solúvel nas amostras foi determinada com base no método desenvolvido por Bradford (1976). O reagente utilizado foi do Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 (Bio-Rad) e albumina do soro bovino foi utilizada como padrão de proteína.

3.9. Determinação do glicerol

A concentração de glicerol residual foi determinada por HPLC (Shimadzu Corporation) equipado com detector de índice de refração RID -10A e coluna Aminex HPX - 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, EUA). A análise foi realizada injetando 20 μL de amostra, a 65 °C, utilizando como fase móvel uma solução de 0,005 mol·L⁻¹ de H₂SO₄ e água ultrapura. O fluxo da fase móvel foi controlado a 0,8 mL·min⁻¹ e o tempo de corrida foram 12 min.

3.10. Clarificação do extrato enzimático

De cultivos realizados por 12 h com as condições do tratamento sem FG-10 (item 3.5.1.c), 400 mL do meio de cultura livre de células, chamado de extrato enzimático, foi centrifugado (14 000·g por 20 min a 4 °C) e o sobrenadante foi diluído com 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. A esse extrato foi adicionado *n*-hexano na proporção de 1:1 (v/v). Esta etapa

de clarificação foi realizada a fim de remover os óleos presentes no meio. A fase aquosa, correspondente ao extrato enzimático clarificado, foi reservada para o processo de purificação e imobilização. Os testes seguintes foram realizados em triplicata.

3.11. Adsorção a suportes hidrofóbicos

O extrato enzimático clarificado foi submetido à apenas uma etapa de purificação e imobilização através da adsorção das enzimas a suportes hidrofóbicos. Os suportes testados neste trabalho foram: Octyl-Sepharose, Immobead 150 e MCI GEL CHP20P, todos provenientes da Sigma-Aldrich. Por ser altamente hidrofóbico, dificultando a penetração da água nos poros das esferas de estireno-divinilbenzeno, o MCI GEL CHP20P foi previamente submetido a uma etapa de hidratação (HERNANDEZ et al., 2011). No processo de imobilização, 1 g de suporte foi adicionado a 20 mL de extrato enzimático clarificado (contendo 8 mg de proteína) e mantido em agitação contínua a 20 °C. Periodicamente, a atividade lipolítica da suspensão e do sobrenadante foi medida utilizando pNPP. Após a adsorção enzimática, os suportes foram filtrados a vácuo em funil de vidro sinterizado, lavados e armazenados em 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 a 4 °C.

3.12. Análise de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As enzimas adsorvidas nos suportes foram fervidas em uma solução contendo SDS e β -mercaptoetanol e 15 μ L do sobrenadante foi aplicado em gel de poliacrilamida (10 %). A eletroforese foi conduzida de acordo com o método proposto por Laemmli (1970), utilizando a unidade de eletroforese Mini VE SE

300-10A-1.0 (Hoefer). As bandas de proteína foram reveladas através da coloração do gel com sais de prata (SWITZER III et al., 1979). O marcador de peso molecular aplicado foi o BenchMark Protein Ladder nº 10747012 (Invitrogen).

3.13. Estabilidade térmica da enzima imobilizada

Amostras de 200 mg de suporte com lipase adsorvida foram suspensas em 2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Os preparados enzimáticos foram incubados a 45 °C e 60 °C por 24 h e suas atividades foram periodicamente medidas pelo método do *p*NPP.

3.14. Efeito de solventes na atividade lipolítica

À suspensão contendo 200 mg de suporte com lipase adsorvida em 1 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,0, foi adicionado 1 mL de solvente de forma a resultar na sua concentração final de 50 % (v/v). Os preparados foram mantidos a 37 °C e 150 rpm por 2 h. A atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade observada inicialmente utilizando *p*NPP. Os solventes testados foram: Acetonitrila, Butanol, Etanol, *n*-Hexano, Isopropanol e Metanol.

3.15. Síntese de Butirato de Etila

Para a reação de síntese, os substratos ácido butírico (0,1 M) e etanol (0,1 M) foram adicionados ao solvente *n*-hexano, mantendo um volume final de 10 mL. A quantidade de enzima imobilizada adicionada foi de 50 % em relação ao peso dos substratos. A reação foi conduzida a 37 °C e 180 rpm por 24 h. Amostras foram coletadas para verificar o grau de esterificação. O

rendimento da reação foi quantificado pela diferença entre a concentração de ácido inicial e a remanescente no meio reacional. Nesta análise, 0,5 mL de amostra foi titulado com NaOH (0,005 N), usando fenolftaleína como indicador e 5 mL de etanol como agente de parada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das diferentes estratégias de cultivo adotadas para produção de lipases

4.1.1. Cultivos em batelada

Uma vez constatado no tratamento **a** (Figura 2) que a cultura estoque manteve os níveis de atividade lipolítica alcançados na otimização feita por Rech et al. (2012), foi possível avaliar os diferentes tratamentos.

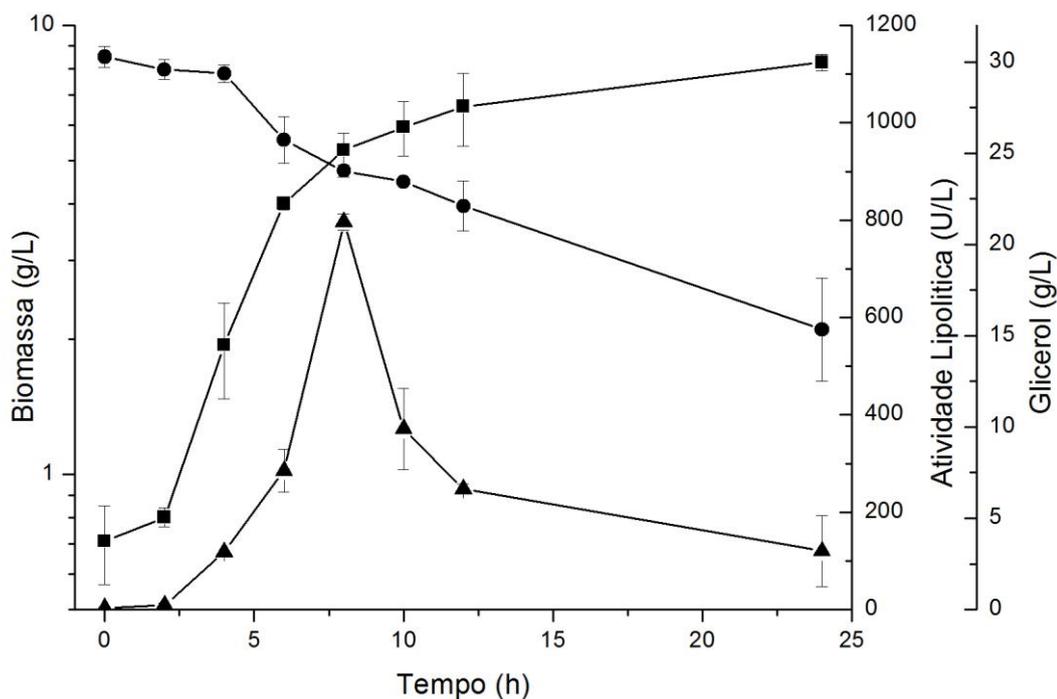


Figura 2. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento **a** (otimizado). (■) Biomassa; (▲) Atividade Lipolítica; (●) Concentração de Glicerol.

Desde o isolamento do microrganismo produtor de lipase e sua posterior identificação como *S. warneri* EX17 (VOLPATO et al., 2009a), estudos foram realizados a fim de apurar as condições de cultivo e alcançar valores mais altos de atividade lipolítica. No entanto, mesmo após a otimização do processo de produção em batelada (RECH et al., 2012), os níveis de atividade enzimática atingidos continuaram aquém dos produzidos comercialmente.

Apesar dos preparados enzimáticos comerciais apresentarem grande atividade catalítica, eles possuem aspectos desfavoráveis que limitam sua utilização, como a inativação da enzima na presença de alguns solventes (LEE et al., 2010). Desta forma, continua sendo desejável o rastreamento e a produção de lipases que sejam naturalmente tolerantes a sistemas não aquosos (JI et al., 2010). As lipases produzidas por *S. warneri* EX17 mostraram ser estáveis na presença de solventes orgânicos (VOLPATO et al., 2008), justificando seu potencial como biocatalisador em processos industriais.

Com o objetivo de aumentar a produção de lipases por *S. warneri* EX17, diferentes estratégias de cultivo foram aplicadas para analisar a influência de algumas variáveis na produção da enzima e então estabelecer as condições de cultivo em batelada alimentada. A Figura 3 apresenta a cinética de crescimento, atividade lipolítica e consumo de substrato no meio sem a presença de óleos (tratamento **a**). Observa-se que o tratamento **b** atingiu quantidade equivalente de biomassa quando comparado ao crescimento do tratamento **a**, em torno de $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Sugere-se, portanto, que o óleo presente no meio de cultivo seja principalmente um indutor para produção de lipases e não

uma importante fonte de carbono para o crescimento microbiano. Ao comparar os níveis de atividade lipolítica dos tratamentos **a** e **b**, verifica-se que a presença de óleo de soja e oliva acelera e favorece a produção de lipases por *S. warneri* EX17. Berekaa et al. (2009) examinaram a produção de enzima lipolítica por *Geobacillus stearothermophilus* monitorando o crescimento do microrganismo em meios com e sem óleo de oliva e também demonstraram que a presença do óleo acelera a produção de lipases. Em concordância com este trabalho, o crescimento de *G. stearothermophilus* no meio sem óleo de oliva resultou em biomassa semelhante ao do meio suplementado.

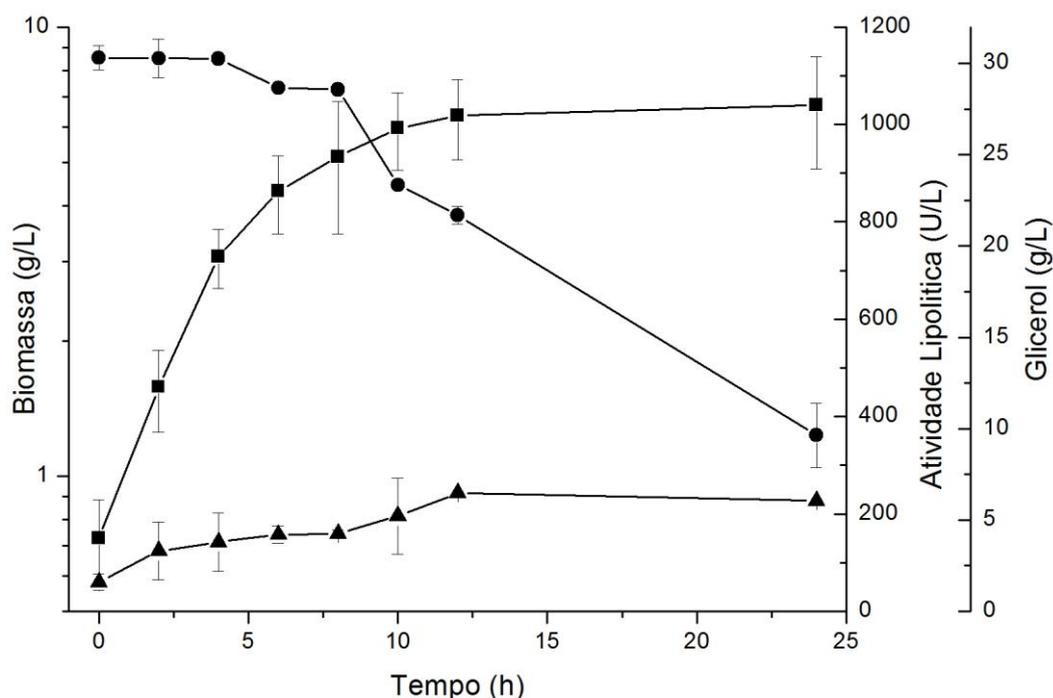


Figura 3. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento **b** (sem óleo). (■) Biomassa; (▲) Atividade Lipolítica; (●) Concentração de Glicerol.

Tendo em vista os resultados encontrados no tratamento **b**, optou-se por não adicionar os óleos de soja e oliva no meio de alimentação em casos de bateladas alimentadas. Uma vez presentes no meio otimizado ao iniciar o cultivo, os óleos permanecem no meio por não constituírem fonte de carbono para crescimento, sendo desnecessária a sua adição no meio de alimentação.

Quando se realizam estudos com microrganismos aeróbios, a concentração de oxigênio é um fator que afeta a produção. A adição de silicone emulsificado provocou efeito positivo na produtividade do sistema, pois o tratamento **a**, conforme mostra a Figura 2, atingiu a máxima atividade lipolítica (por volta de $800 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$) com 8 h de cultivo, enquanto que o tratamento **c** (sem FG-10) alcançou esse nível de produção em 12 h (Figura 4). Uma das propriedades do silicone é ser quimicamente inerte no meio de cultivo (ATES et al., 2006), porém altas concentrações deste componente aumentam a viscosidade do meio e podem causar certa resistência à transferência de oxigênio (LEONHARDT et al., 1985). Por essa razão, nos cultivos em batelada alimentada, o FG-10 foi adicionado ao meio inicial para aumentar a solubilidade do oxigênio no meio de cultura, mas não foi adicionado ao meio de alimentação do biorreator.

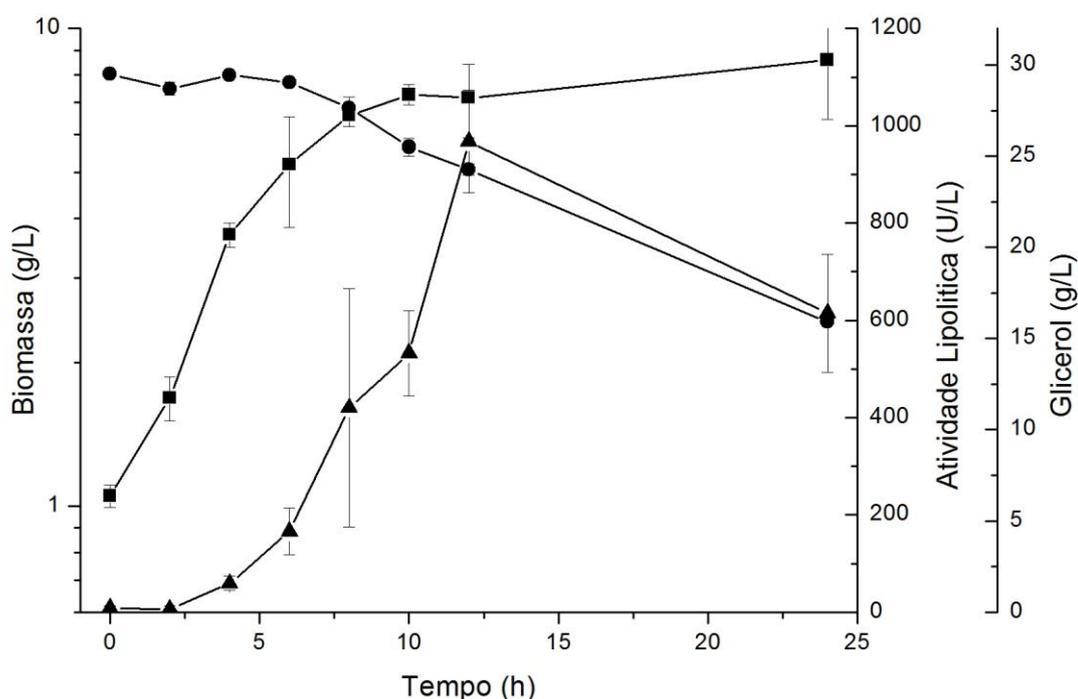


Figura 4. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol nos experimentos do tratamento **c** (sem FG-10). (■) Biomassa; (▲) Atividade Lipolítica; (●) Concentração de Glicerol.

Para investigar o efeito da concentração do inóculo no crescimento celular, na formação do produto e no consumo de glicerol, células de *S. warneri* EX17 foram centrifugadas e ressuspensas em 150 mL de meio até que o inóculo atingisse concentração celular 3 e 6 vezes maior. A Figura 5 mostra que o aumento na concentração do inóculo encurtou o tempo para atingir a máxima produção enzimática, embora os níveis de atividade não tenham superado o total alcançado com o inóculo padrão ($DO_{600\text{ nm}} = 1,0$). Lee et al. (1999) relataram efeito semelhante ao aumentar a concentração do inóculo para produção de ácido succínico por *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. O aumento na concentração inicial de células resultou em um discreto aumento

na biomassa final e na produtividade do ácido succínico, entretanto o rendimento do produto não foi favorecido com as alterações no inóculo. A fim de apurar o efeito da concentração do inóculo na produção de lipases por *Rhizopus arrhizus*, Elibol & Özer (2000b) realizaram experimentos com 4 concentrações de inóculo e concluíram que esta variação não resultou em efeito significativo na atividade lipolítica.

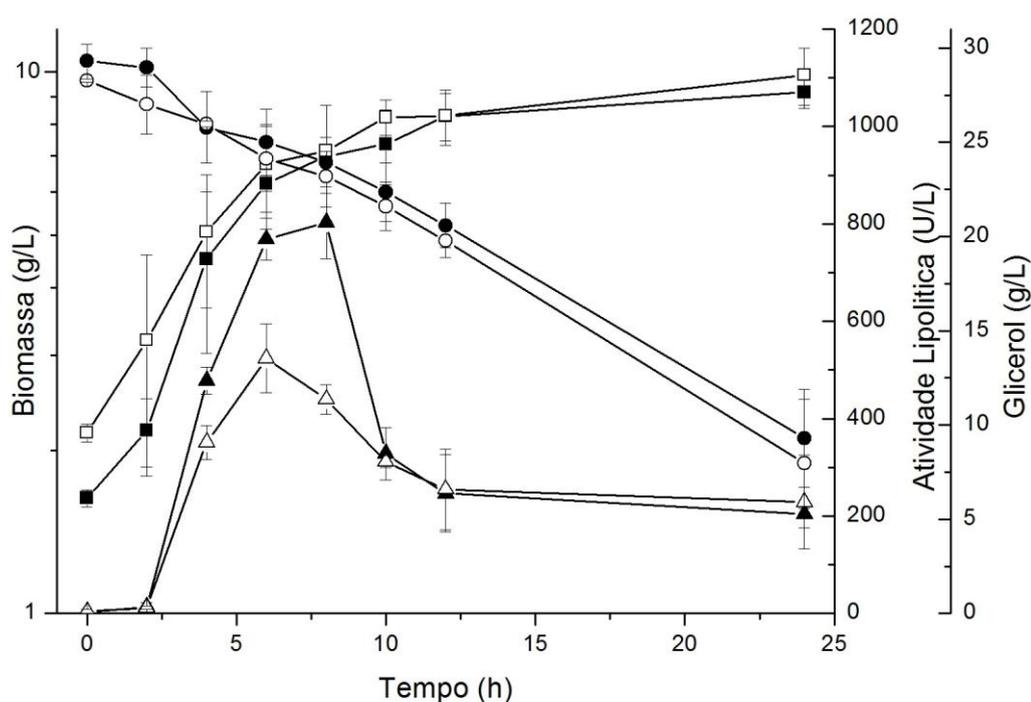


Figura 5. Efeito da concentração do inóculo no crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol. Os símbolos fechados representam o tratamento **d** ([Inóculo] 3x) e os símbolos abertos correspondem ao tratamento **e** ([Inóculo] 6x). (■) Biomassa; (▲) Atividade Lipolítica; (●) Concentração de Glicerol.

4.1.2. Batelada alimentada

Ao iniciar um cultivo em batelada alimentada com uma solução relativamente diluída de substrato, procura-se evitar taxas de crescimento

elevadas que possam resultar em uma demanda de oxigênio excessiva e limitante para o crescimento do microrganismo (DORAN, 1995). Foi possível constatar nos 5 tratamentos operados em batelada que não houve consumo total do glicerol, restando em média $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de substrato no meio de cultura ao fim dos cultivos. Com o objetivo de manter baixos níveis de glicerol no meio de cultivo e minimizar efeitos de repressão catabólica, decidiu-se começar o cultivo em batelada alimentada com $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicerol no meio. Uma vez que o substrato se torna limitante com sua concentração tendendo a zero, a batelada alimentada caracteriza-se por apresentar o crescimento do microrganismo a uma taxa mais lenta, porém por período mais longo, possivelmente favorecendo a obtenção do produto.

No entanto, a Figura 6 mostra que após o início da alimentação em 4 h de cultivo, o glicerol fornecido passou a se acumular no meio de cultura, descaracterizando um processo em batelada alimentada. Ju et al. (2012) avaliaram diferentes estratégias de cultivo para melhorar a produção de esterases por *Pseudomonas sp.* ECU1011 e observaram que durante a alimentação do sistema com glicerol a concentração deste substrato permaneceu próxima a $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, caindo drasticamente somente após o término da alimentação. Os autores concluíram que a alimentação com glicerol não afetou a produção da enzima, embora a presença deste componente no meio inicial seja um indutor da produção. Gupta et al. (2004), Lin et al. (2006) e Volpato et al. (2008) também descreveram um papel indutor do glicerol ao estudarem a produção de lipases.

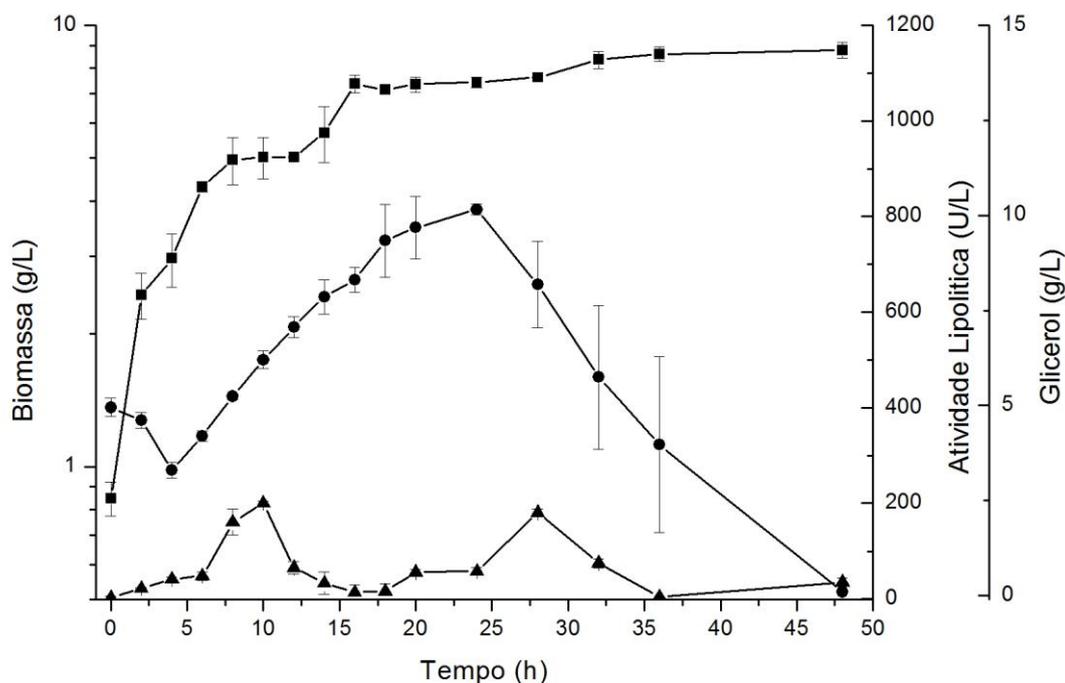


Figura 6. Cinética de crescimento microbiano, produção enzimática e consumo de glicerol no cultivo em batelada alimentada. (■) Biomassa; (▲) Atividade Lipolítica; (●) Concentração de Glicerol.

Ainda na Figura 6, é possível observar que a cinética de crescimento apresenta duas fases exponenciais acompanhadas por um aumento na atividade lipolítica, reforçando que a produção de lipases extracelulares por *S. warneri* está relacionada com o crescimento (TALON et al., 1995). A concentração de enzima ativa começa a aumentar ao final da fase de crescimento exponencial e atinge seu máximo durante a fase estacionária; este mesmo perfil de atividade lipolítica foi relatado por Lechner et al. (1988) ao investigar a produção de lipases por *S. carnosus*.

Durante o período de cultivo, as lipases de *S. warneri* passam por um processo de maturação, sendo inicialmente secretadas como uma prolipase

(90 kDa) que posteriormente é processada no sobrenadante originando uma lipase madura de 45 kDa (TALON et al., 1995). Com um período de incubação prolongado, ocorre uma degradação espontânea da proteína e provavelmente seja na estrutura de 45 kDa da enzima que se encontra o sítio ativo (ROLLOF & NORMARK, 1992). Dessa forma, no momento em que a lipase atinge sua conformação madura o sítio ativo da enzima fica mais acessível ao substrato, resultando em um pico de atividade lipolítica. Em conformidade com o presente estudo, Talon et al. (1995) não encontraram atividade proteolítica no sobrenadante da cultura de *S. warneri* e propuseram que uma atividade autolítica da enzima possa estar relacionada com a ascensão e o declínio da lipase madura.

Diversamente, a produção de lipases por *S. carnosus* em biorreator com sistema de diálise conduziu ao acúmulo das enzimas secretadas ao longo de 46 h de cultivo (LECHNER et al., 1988). Os autores apontaram a retirada de subprodutos tóxicos de baixo peso molecular pela diálise como uma vantagem do sistema. Supõe-se que esta renovação do meio evite a degradação da enzima e seu perfil com picos de atividade lipolítica como o encontrado neste trabalho (Figura 6).

4.2. Purificação e Imobilização

Devido a grande hidrofobicidade do PDMS (WONG & HO, 2009), que poderia influenciar na adsorção da enzima nos diferentes suportes, os cultivos realizados para testes de purificação e imobilização foram conduzidos sem adição de FG-10. Amostras foram clarificadas e então utilizadas no processo de adsorção da lipase de *S. warneri* EX17 aos suportes hidrofóbicos.

A Figura 7 mostra a curva de imobilização da lipase nos três suportes. A atividade residual medida no sobrenadante representa uma porcentagem da atividade inicial observada no extrato enzimático clarificado. Nos três casos a imobilização ocorreu rapidamente, alcançando rendimento superior a 90 % para todos os suportes após 3 h.

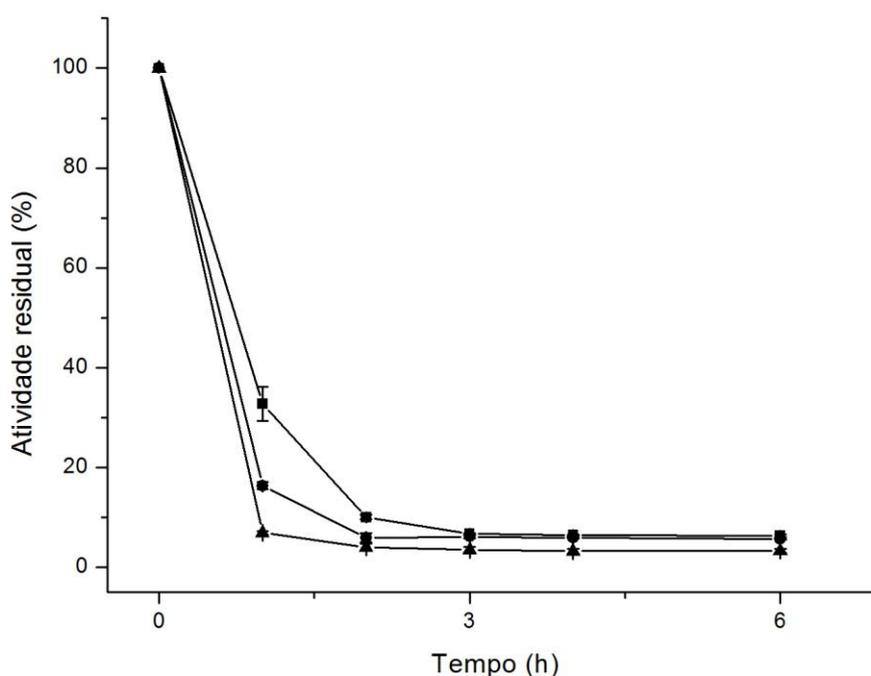


Figura 7. Curva de imobilização da lipase nos diferentes suportes. 1 g de cada suporte foi suspenso em 20 mL de extrato enzimático contendo $0,4 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteína. (■) Immobead; (●) Octyl; (▲) MCI GEL CHP20P.

No entanto, não se pode descartar que houve diferença de interação entre a enzima e os suportes. A imobilização com MCI GEL CHP20P alcançou 90 % de rendimento em apenas 1 h. Considerando que esferas de estireno-divinilbenzeno são tão hidrofóbicas a ponto de impedir a penetração da água em seus poros (HERNANDEZ et al., 2011), deve haver maior afinidade da

enzima com este suporte. Em concordância, o suporte Immobead, cuja matriz possui algumas unidades polares em suas cadeias poliméricas (KÜÇÜK et al., 1995), tem caráter menos hidrofóbico e conseqüentemente apresentou a trajetória de imobilização mais lenta.

Ao final do processo de imobilização, foi observado um aumento na atividade lipolítica de 1,5 vezes para Octyl-SWL, 1,4 para MCI-SWL e 1,1 para Immobead-SWL. Esse aumento na atividade sugere que a enzima foi imobilizada através da ativação interfacial ao suporte, desta forma estabilizando a sua conformação aberta (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

As enzimas desorvidas dos suportes após a fervura em solução contendo SDS e β -mercaptoetanol foram analisadas por eletroforese (Figura 8). A adsorção de lipases a suportes hidrofóbicos em meio de baixa força iônica se mostrou eficiente para purificação e imobilização da enzima. Nas linhas 3 e 4 (Octyl e MCI GEL CHP20P, respectivamente) visualiza-se principalmente uma banda de aproximadamente 45 kDa, correspondente a lipase purificada de *S. warneri* EX17. Este resultado mostra-se bastante relevante, pois a purificação da enzima em apenas uma etapa certamente acarreta em diminuição de custos de produção.

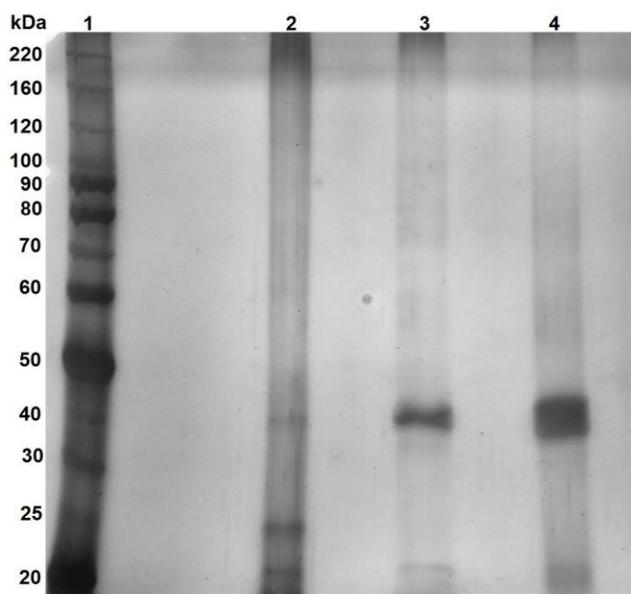


Figura 8. Análise por eletroforese das enzimas imobilizadas nos diferentes suportes. As bandas de proteína foram reveladas através da coloração do gel com sais de prata. (1) Marcador de peso molecular; (2) Immobead; (3) Octyl; (4) MCI GEL CHP20P.

Já na linha 2 (Immobead) nota-se a presença de três bandas sutis entre 40, 25 e 20 kDa. A análise do gel confirma a menor eficiência do Immobead para imobilização de lipases por interação hidrofóbica.

4.3. Estabilidade térmica da enzima imobilizada

As lipases imobilizadas de *S. warneri* EX17 foram incubadas a 45 °C e 60 °C a fim de avaliar sua estabilidade térmica. Os três preparados enzimáticos mantiveram mais de 90 % de atividade lipolítica após 24 h a 45 °C. Contudo, os resultados apresentados na Figura 9 indicam que a lipase perdeu rapidamente sua atividade a 60 °C. O preparado enzimático mais estável nessa condição foi Octyl-SWL, que manteve mais de 50 % de atividade até 3 h de incubação. Neste mesmo intervalo os demais preparados apresentaram menos de 5 % de atividade residual.

Hernandez et al. (2011) compararam a estabilidade térmica da enzima CALB (Novozymes) imobilizada em diferentes suportes e descreveram resultado semelhante ao encontrado no presente trabalho, uma vez que o preparado CALB-Decaoctyl foi muito mais estável que CALB-MCI. Supostamente, suportes com matriz de poliestireno, como o MCI GEL CHP20P, podem causar efeitos indesejáveis na estabilidade da enzima através da imobilização de unidades hidrofóbicas residuais durante a vibração da enzima causada pela temperatura (SANDWICK & SCHRAY, 1987). Dessa forma, a conformação aberta da lipase pode ter sido desestabilizada e, conseqüentemente, a atividade lipolítica foi reduzida.

Em estudo anterior realizado por Volpato et al. (2009b), lipases de *S. warneri* EX17 foram imobilizadas em glioxil, octyl-agarose e brometo de cianogênio. A análise da estabilidade térmica a 60 °C dos preparados enzimáticos apresentou resultado diverso apenas para o preparado Glioxil-SWL, que manteve 50 % de atividade após 24 h de incubação. Diferentemente dos outros suportes estudados, a imobilização da lipase em glioxil ocorreu por ligação covalente multipontual, o que mantém mais rígida a estrutura da enzima. Os resultados evidenciam que o tipo de interação entre enzima e suporte é determinante para as propriedades finais do preparado enzimático.

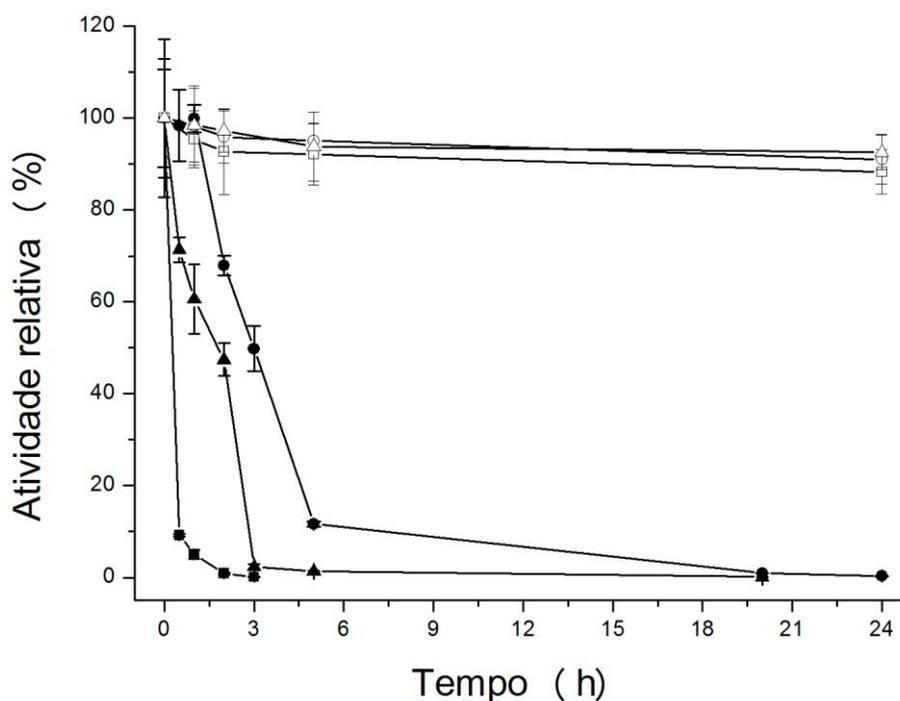


Figura 9. Estabilidade térmica dos diferentes preparados enzimáticos de SWL. 200 mg de suporte com lipase adsorvida foram suspensos em 2 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0 e incubados a 45 °C (símbolos abertos) e 60 °C (símbolos fechados) por 24 h. (■) Immobead; (●) Octyl; (▲) MCI GEL CHP20P.

4.4. Efeito de solventes na atividade lipolítica

A maioria das bactérias e suas enzimas são destruídas ou inativadas na presença de solventes orgânicos, sendo que a maioria das cepas tolerantes pertence aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* (SARDESSAI & BHOSLE, 2004). Algumas cepas do gênero *Staphylococcus* foram citadas como produtoras de lipases tolerantes a solventes orgânicos (FANG et al., 2006; VOLPATO et al., 2008); estes trabalhos testaram a tolerância da enzima livre. A interação entre a lipase e o suporte após a imobilização muitas vezes

aumenta a resistência da enzima contra inativação por agentes desnaturantes como solventes (TORRES-SALAS et al., 2011).

A Tabela 2 mostra a estabilidade na presença de solventes dos preparados enzimáticos de SWL que foram imobilizados por adsorção a suportes hidrofóbicos. O perfil enzimático adsorvido ao Immobead (Figura 8), constituído por lipases de menor peso molecular ou por proteínas contaminantes, possivelmente resultou na pequena atividade apresentada pelo preparado Immobead-SWL após a exposição à maioria dos solventes. Salvo para as soluções de etanol e *n*-hexano, nas quais o extrato enzimático bruto já havia demonstrado boa estabilidade (VOLPATO et al., 2008), o preparado Immobead-SWL manteve 50 % de atividade lipolítica.

Tabela 2. Efeito de solventes na estabilidade dos preparados enzimáticos de SWL.

Solvente (50 %)	log <i>P</i>	Atividade residual ^a (%)		
		Immobead-SWL	Octyl-SWL	MCI-SWL
Controle	—	100	100	100
Metanol	-0,76	22,5 ± 0,4	147,0 ± 5,5	96,5 ± 5,6
Acetonitrila	-0,33	14,2 ± 0,6	38,3 ± 4,8	29,5 ± 3,1
Etanol	-0,24	54,6 ± 11,2	143,7 ± 4,6	78,5 ± 8,3
Isopropanol	0,28	33,6 ± 5,7	149,4 ± 7,1	41,8 ± 4,3
Butanol	0,80	13,9 ± 1,2	121,8 ± 6,6	62,2 ± 17,7
<i>n</i> -Hexano	3,50	75,9 ± 3,5	148,3 ± 3,6	100,0 ± 15,6

^a Amostras de 200 mg dos preparados enzimáticos foram suspensas em 2 mL de cada solução de solvente e mantidas a 37 °C, 150 rpm por 2 h. A atividade foi medida após este período.

Os preparados Octyl-SWL e MCI-SWL preservaram a atividade lipolítica quando expostos aos solventes, exceto na presença de acetonitrila. Em concordância com estes resultados, Hun et al. (2003) relataram que

solventes de alta polaridade como a acetonitrila ($\log P = -0,33$) causaram completa inativação da lipase de *B. sphaericus* 205y, enquanto que solventes de baixa polaridade como o *n*-hexano ($\log P = 3,5$) aumentaram a atividade da enzima.

Em presença de solventes orgânicos ou interfaces lipídicas, as lipases encontram-se em sua conformação aberta. A hiperativação observada no preparado Octyl-SWL sugere que, nestas condições, a ligação da enzima ao suporte propiciou que uma maior zona hidrofóbica da enzima interagisse com o substrato.

4.5. Síntese de Butirato de Etila

A reação de esterificação foi proposta com o objetivo de avaliar a capacidade de síntese da enzima imobilizada nos diferentes suportes. O produto, butirato de etila, é um éster de cadeia curta com aroma de frutas, semelhante ao de abacaxi.

Na Figura 10 estão expostos os rendimentos de esterificação dos preparados enzimáticos. Assim como nos testes anteriores, o preparado Immobead-SWL apresentou baixo desempenho em função da carga enzimática adsorvida. Por outro lado, Octyl-SWL e MCI-SWL obtiveram rendimento significativo de 28 % e 35,6 %, respectivamente.

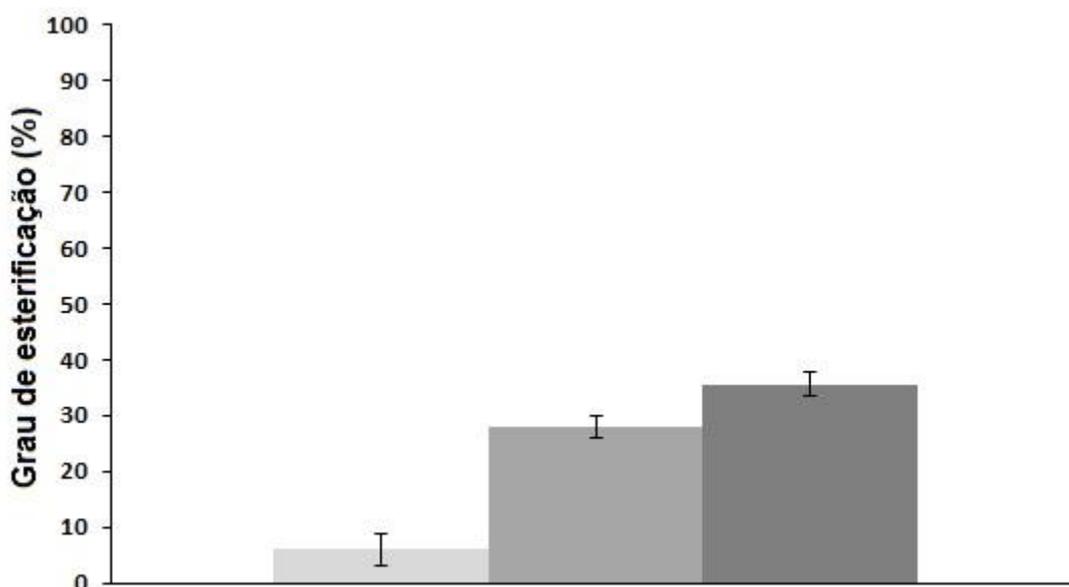


Figura 10. Síntese de butirato de etila por preparados enzimáticos de SWL. A reação foi conduzida a 37 °C e 180 rpm por 24 h. (■) Immobead; (■) Octyl; (■) MCI GEL CHP20P.

Talon et al. (1996) avaliaram o potencial de lipases imobilizadas de *S. warneri* e *S. xylosus* em sílica gel na síntese de ésteres aromáticos. Os autores relataram que o grau de esterificação aumentou com o aumento do número de carbonos na cadeia do ácido. O melhor rendimento foi atingido com o ácido decanóico, cuja esterificação foi completa após 7 dias de reação com lipases de *S. warneri* e chegou a 35 % com lipases de *S. xylosus*. A esterificação de ácidos de cadeia curta (como o butírico) foi muito baixa para as duas lipases, não ultrapassando 2 % de conversão. Neste caso, Octyl-SWL e MCI-SWL exibiram desempenho promissor em 24 h.

Diferentes parâmetros de reação foram investigados para melhorar a síntese de ésteres em presença de solventes orgânicos por lipases de *S. simulans* imobilizadas em carbonato de cálcio (KARRA-CHÂBOUNI et al.,

2006). Conversão de 78 % de valerato de etila foi obtida em 24 h com a adição de 20 % de água ao meio de reação. No caso do acetato de hexila, a adição de 10 % de água resultou no melhor rendimento, que foi de 75 % de conversão em 48 h.

É difícil comparar os resultados publicados na literatura porque o rendimento de conversão varia entre os preparados enzimáticos. Sabe-se que a capacidade catalítica das lipases em reações de síntese está vinculada à natureza do suporte e à quantidade de enzima imobilizada, assim como depende da polaridade dos substratos, do solvente empregado e da quantidade de água presente na mistura. Considerando que, neste trabalho, a quantidade de enzima imobilizada por grama de suporte foi de aproximadamente $8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, os resultados indicaram uma elevada atividade específica para Octyl-SWL e MCI-SWL. O rendimento de conversão de butirato de etila obtido por estes preparados enzimáticos foi de $51,3 \text{ mmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína e $65,2 \text{ mmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. Estes valores são notavelmente superiores aos rendimentos alcançados na síntese de valerato de etila ($1,3 \text{ mmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) e acetato de hexila ($2,5 \text{ mmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) por lipases de *S. simulans* imobilizadas em carbonato de cálcio (KARRA-CHÂABOUNI et al., 2006).

5. CONCLUSÕES

As diferentes estratégias adotadas na execução dos experimentos em biorreatores revelaram que a produção de lipases por *S. warneri* EX17 é facilmente afetada pelas condições de cultivo. A presença dos óleos de soja e oliva é determinante para a produção de lipases, porém não é significativa para o crescimento celular. Também foi possível salientar a importância do silicone emulsificado FG-10 e o efeito da concentração inicial de células na produtividade do sistema.

O cultivo em batelada alimentada confirmou que a produção de SWL está relacionada ao crescimento celular, embora as cinéticas de produção enzimática e consumo de substrato não tenham sido características deste processo. Diante desta relação, a alimentação contínua não foi apropriada, sugerindo que um perfil de alimentação exponencial possa ser mais adequado para aprimorar a produção de lipases por *S. warneri* EX17.

Ainda que o nível de atividade lipolítica produzido não tenha sido superado, as propriedades de SWL justificam futuros estudos com *S. warneri* EX17. A adsorção da lipase aos suportes Octyl e MCI GEL CHP20P se mostrou eficiente para purificação e imobilização da enzima em apenas uma etapa. Os preparados enzimáticos mantiveram-se estáveis a 45 °C e na presença de solventes, reforçando o potencial de SWL para aplicações industriais de síntese.

O teste preliminar para síntese de ésteres aromáticos indicou índices de conversão significativos para Octyl-SWL e MCI-SWL. Considerando a produção de butirato de etila, o potencial de síntese de SWL pode ser melhorado através da aplicação de um estudo de planejamento experimental. Como descrito na literatura, a lipase SWL pode ainda ser útil para a produção de ésteres de cadeia longa, tornando-se uma enzima com aplicação bastante versátil.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados indicam que, para melhorar a produção de lipases por *S. warneri* EX17, o desenvolvimento de uma estratégia de cultivo com alimentação exponencial seja uma alternativa. Considerando o investimento necessário para o emprego desta técnica, as ferramentas de biologia molecular disponíveis podem ser uma opção mais próxima. Muitas lipases são produzidas por microrganismos recombinantes, como a CALB e a Lecitase Ultra (Novozymes).

A capacidade de síntese de ésteres dos preparados enzimáticos pode ser aumentada com estudos de planejamento experimental. Adicionalmente, outras reações necessitam ser testadas, como o uso de SWL na síntese de biodiesel.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCADE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 281-287, 2006.

ALONSO, F. O. M. Efeitos da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). 2001. Dissertação (Mestre em Ciências) - Departamento de Fármacos - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

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.; OZENIR, 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 irregular*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 57, p. 2739-2744, 2009.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 486-493, 1998.

BEREKAA, M. M.; ZAGHLOUL, T. I.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; SAEED, H. M.; SIFOUR, M. Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 287-294, 2009.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: **Interciências**, 2008. 506 p.

BORNSCHEUER, U. T. Trends and Challenges in Enzyme Technology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 100, p. 181-203, 2005.

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

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: **Wiley-VCH**, 2005. 448 p.

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.

CARVALHO, P. O.; CALAFATI, S. A.; MARASSI, M.; DA SILVA, D. M.; CONTESINI, F. J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v. 28(4), p. 614-621, 2005.

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.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U. J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 143-153, 2002.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

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.

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. London: **Academic Press**, 1995. 439 p.

D'SOUZA, S. F. Immobilized enzymes in bioprocess. **Current Science**, v. 77, p. 69-79, 1999.

EIJKMAN, C. Über Enzyme bei Bakterien und Schimmelpilzen. **Cbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskr.**, v. 29, p. 841-848, 1901.

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

ELIBOL, M.; ÖZER, D. Lipase production by immobilised *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 219-223, 2000b.

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.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme Microbial Technology**, v. 41, p. 565-569, 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061-1067, 2008.

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.

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.

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, 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.

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

HENES, B.; SONNLEITNER, B. Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity. **Journal of Biotechnology**, v. 132(2), p. 118-126, 2007.

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme Microbial Technology**, v. 49, p. 72-78, 2011.

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

HUN, C. J.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 147-151, 2003.

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.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; VAN HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.

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

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

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.

JI, Q.; XIAO, S.; HE, B.; LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 264-269, 2010.

JU, X.; YU, H-L.; PAN, J.; XU, J-H. Improved production of *Pseudomonas sp.* ECU1011 acetyl esterase by medium design and fed-batch fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 323-331, 2012.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1692-1698, 2006.

KLIBANOV, A. M. Enzymes: Nature's chemical machines. **Technology review**, v. 86, p. 40-48, 1983.

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.

KÜÇÜK, I.; KUYULU, A.; OKAY, O. Effect of diluents on the porous structure of crosslinked poly(methyl methacrylate) beads. **Polymer Bulletin**, v. 35, p. 511-516, 1995.

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

LECHNER, M.; MÄRKEL, H.; GÖTZ, F. Lipase production of *Staphylococcus carnosus* in a dialysis fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 345-349, 1988.

LEE, K. W.; MIN, K.; PARK, K.; YOO, Y. J. Development of an amphiphilic matrix for immobilization of *Candida antarctica* lipase B for biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, p. 603-607, 2010.

LEE, P. C.; LEE, W. G.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 49-55, 1999.

LEONHARDT, A.; SZWAJECER, E.; MOSBACH, K. The potential use of silicon compounds as oxygen carriers for free and immobilized cells containing L-amino acid oxidase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 162-166, 1985.

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.

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.

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

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

LUX, K. O Erro de Adam Smith. **Nobel**, 1993, 224 p.

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.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.68, p. 109-115, 2011.

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

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.; 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.

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.

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(2), p. 135-140, 2003.

PERNAS, M. A.; LÓPEZ, C.; RÚA, M. L.; HERMOSO, J. Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **FEBS Letters**, v. 501, p. 87-91, 2001.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri: **Manole**, 2005. 440 p.

RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 187-192, 2001.

RECH, F. R.; VOLPATO, G.; AYUB, M. A. Z. The effects of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient (kLa) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, p. 990-995, 2012.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através da transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 2009. Tese (Doutor em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

ROLLOF, J.; NORMARK, S. In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 1844-1847, 1992.

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

SANDWICK, R. K.; SCHRAY, K. J. The inactivation of enzymes upon interaction with a hydrophobic latex surface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 115, p. 130-138, 1987.

SARDESSAI, Y. N.; BHOSLE, S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 655-660, 2004.

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, 2003a.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003b.

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

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.

SWITZER III, R. C.; MERRIL, C. R.; SHIFRIN, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 98, p. 231–237, 1979.

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.

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

TAMERLER, C.; KESHAVARZ, T. Lipolytic enzyme production in batch and fed-batch cultures of *Ophiostoma piceae* and *Fusarium oxysporum*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, p. 785-790, 2000.

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

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326-335, 1999.

TORRES-SALAS, P.; MONTE-MARTINEZ, A.; CUTIÑO-AVILA, B.; RODRIGUEZ-COLINA, B.; ALCALDE, M.; BALLESTEROS, A. O.; PLOU, F. J. Immobilized biocatalysts: novel approaches and tools for binding enzymes to supports. **Advanced Materials**, v. 23, p. 5275-5282, 2011.

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, R. C.; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Z. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 821-828, 2008.

VOLPATO, G.; RODRIGUES, R. C.; HECK, J. X.; AYUB, M. A. Z. 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, 2009a.

VOLPATO, G.; FILICE, M.; RODRIGUES, R. C.; HECK, J. X.; GUIBAN, J. M.; MATEO, C.; AYUB, M. A. Z. Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, p. 125-132, 2009b.

WANG, J.; LI, S. H.; MO, J-W.; PORTER, J.; MUSAMEH, M. M.; DASGUPTA, P. K. Oxygen-independent polydimethylsiloxane based carbon paste glucose biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 999-1003, 2002.

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

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

WONG, I.; HO, C-M. Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices. **Microfluid Nanofluid**, v. 7, p. 291-306, 2009.

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