

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LIPASE ALCALINA SECRETADA
POR UM ISOLADO DE *Candida parapsilosis***

RODOLFO KRÜGER DA CÂMARA RIBAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Valente

Porto Alegre, Julho de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde e no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Fontes financiadoras: CNPq, CAPES e FAPERGS.

A meu pai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente à minha orientadora, Patricia Valente, por tudo que realizou por mim e por tudo que conquistamos. Agradeço pelo exemplo que é de pessoa, de profissional, de docente e de pesquisadora, porque tem no que faz sua vida. Pela redobrada confiança e paciência dispensadas, pelos conselhos, pela compreensão, por tudo: muito, muito obrigado. Só tinha de ser com você, mesmo.

Obrigado à professora Marilene Vainstein, que gentilmente abriu suas portas e cedeu um importantíssimo espaço para realização deste trabalho.

Agradeço à professora Simone Flôres, por me receber e auxiliar na elaboração e análise de experimentos. Esse trabalho não teria sido possível sem este valioso auxílio.

Obrigado aos colegas Maurício Ramírez e Sandra Mendes, pelo sequenciamento e análise realizados em meio a suas tantas sequencias e outros percalços. Sua contribuição foi fundamental para enriquecer este trabalho.

Agradeço à presteza, ao interesse, e à amizade do meu colega e amigo Diórgenes Carboni. Um fiel escudeiro, desde a bancada e a autoclave até o bar e o violão.

Obrigado à Professora Luciana Senter, que de perto ou de longe sempre ministrou exemplos de superação, esforço e conquista. É a prova de que só o trabalho prospera, e que a felicidade está no lugar onde a gente é feliz.

Agradeço a todos os colegas e amigos do laboratório 220, um círculo de relações que sustentou boa parte do meu ânimo quando os resultados não davam certo. A parceria do Éder, a risada da Cláudia, a calma da Pati, a doçura da Amanda, o sorriso da Letícia, a presteza de todos e de todas.

Meu reconhecimento ao Dr. Abreu, por toda sorte de idéias e saídas que encontramos ao longo do percurso, dentro e fora da academia.

Agradeço a meus amigos, parceiros, irmãos: Por vocês procrastinei, e sua contribuição não está nesse trabalho. Está em minha vida.

Mas não há palavras literais que expressem a gratidão à minha família. Apenas *agradeço*.

Agradeço

“Agradeço às metáforas, à sapiência, ao orvalho e às frutas maduras.

A tudo que for vida, como diz o poeta. Ao que é breve, e à finitude que permite o realizar, segundo o filósofo.

Agradeço à maré, motriz, matriz, nutriz, que abraça e desfaz os crespos castelos da areia, preparando a praia para o novo dia.

Às ondas do rádio, às ondas sonoras, às ondas que carregam toda sorte de desígnio. Que vibram em harmonia e trazem, em uníssono, sorte, conforto e paz ao saber.

Agradeço aos calos, à insônia e à azia, ao cheiro ocre e à fumaça gris. Ao odor mentol e à voz monofônica. Agradeço ao gosto de sal da linha mascada, ao cheiro de alga no escuro molhado, ao pingo fiel, analista e boboca.

Agradeço, sem palavras que bastem, à vida, o Deus inominável, que junto de parte de mim, consigo, tem parte de si novamente.

A vida é uma gangorra. Brincar nela é a melhor saída”

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 A biocatálise.....	15
1.2 Lipases.....	16
1.3 <i>Candida parapsilosis</i>	20
1.4 <i>Design</i> Fatorial de Plackett-Burman.....	24
2. Objetivos.....	25
2.1 Objetivos Gerais.....	25
2.2 Objetivos Específicos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Reagentes.....	26
3.2 Amostras	26
3.3 Seleção preliminar	28
3.4 Indução em meio líquido	28
3.5 Ensaio enzimático	28
3.6 Otimização univariada da indução da lipase da levedura selecionada	29
3.7 Otimização de indução por Plackett-Burman	30
3.8 Otimização da atividade enzimática.....	32
3.9 Estabilidade da atividade enzimática	32
3.10 Identificação da levedura selecionada	33
3.11 Análise estatística	34
4. RESULTADOS	35
4.1 Produção de lipase	35
4.2 Caracterização enzimática	44

5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	56
7. BIBLIOGRAFIA.....	57
ANEXO 1 - LISTA DE REAGENTES E FABRICANTES.	68
ANEXO 2: MANUSCRITO REDIGIDO PARA SUBMISSÃO A REVISTA CIENTÍFICA	69
ANEXO 3: CURRICULUM VITÆ resumido	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> , indicando a estrutura de “tampa” (Lid), e a tríade catalítica (D230, H289 e S182). Reproduzido de Fickers et al. (2011).....	17
Figura 2: Árvore filogenética ilustrando espécies relacionadas a <i>C. parapsilosis</i> . Árvore construída a partir de sequências do domínio D1/D2 da porção 26S do gene de RNA ribossômico, utilizando o método de neighbor-joining. Reproduzido de Nozek, 2009.	23
Figura 3: Gráfico de atividade enzimática das linhagens testadas em meio indutor sob agitação.	37
Figura 4: Valores de atividade lipolítica das melhores linhagens testadas.....	38
Figura 5: Efeito da fonte de carbono sobre a produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. Tw20: Tween 20 0,5%; Tw80: Tween 80 0,5%; Sj: óleo de soja 0,5%; Olv: óleo de oliva 0,5%; Cels: sobrenadante bruto com células; Centr: sobrenadante centrifugado.....	39
Figura 6: Efeito do pH e da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. P: peptona 0,5%; T: triptona 0,5%; 6/9: pH inicial; Cels: sobrenadante bruto com células; Centr: sobrenadante centrifugado livre de células.	40
Figura 7: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. Temperaturas testadas de 25, 30, 35 e 40 °C.....	42
Figura 8: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. Temperaturas de 25 e 30 °C.	43

Figura 9: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. Temperaturas de 25 e 35 °C.	43
Figura 10: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura <i>C. parapsilosis</i> QU110. Temperaturas de 25 e 40 °C.	44
Figura 11: Atividade enzimática sobre <i>p</i> -nitrofenil palmitato, frente à variação de pH e temperatura. Superfície de resposta do extrato livre de células.	45
Figura 12: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diferentes surfactantes.....	46
Figura 13: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diferentes sais.....	47
Figura 14: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diversos solventes em diferentes concentrações.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Algumas vantagens ambientais e econômicas dos princípios da química “verde” (adaptado de Tucker, 2006).....	16
Tabela 2: Reações catalisadas por lipases.	18
Tabela 3: Aplicações de lipases em alguns segmentos industriais (modificado de Sharma et al., 2011).....	19
Tabela 4: Linhagens utilizadas no estudo, e seus substratos de origem.	27
Tabela 5: Condições experimentais utilizadas no design experimental de Plackett-Burman para análise de indução lipolítica em <i>C. parapsilosis</i> QU110.	31
Tabela 6: Condições experimentais utilizadas no design fatorial por componente central na otimização da atividade enzimática do extrato bruto de <i>C. parapsilosis</i> QU110.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius centígrados

26S: subunidade maior do RNA ribossomal nuclear

µmol: Micro-mol

Asp: Aspartato

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CBS: Centraal Bureau voor Schimmelcultures

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

E.C.: Enzyme Comission

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

His: Histidina

IMUFRJ: Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

ITS: Espaçador Intergênico transcrito

L: Litro

M: Molar

Min: Minuto

mL: Mililitro

mM: Milimolar

nm: Nanômetros

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Cologaritmo da atividade de Hidrogênio em uma solução

pNPP: *p*-nitrofenil Palmitato

RAPD: Amplificação aleatória de DNA polimórfico

rDNA: DNA ribossômico (porção de DNA codificante para ribossomos)

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

SDS: Sódio Dodecil Sulfato

Ser: Serina

TRIS: Tris Hitroximetil Aminometano

U: unidade

YNB: Yeast Nitrogen Base

RESUMO

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são serina-hidrolases e agem em sobre ésteres de ácidos graxos de cadeia curta. Elas exibem atividade específica e enantiosseletiva, e sendo assim, há vasto interesse comercial, em pesquisa e indústria de biotecnologia. Lipases microbianas são interessantes para indústria, devido à facilidade de purificação e alta produção que permitem. Muitas leveduras possuem capacidade de produzir naturalmente estas enzimas, permitindo a obtenção de lipases não-transgênicas e com maior rapidez. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipase em leveduras selvagens e otimizar a sua produção em uma linhagem selecionada, bem como caracterizar esta enzima. Uma varredura inicial foi realizada em placas de Tween 80 e Ágar-óleo. Leveduras com crescimento positivo foram então cultivadas em meio mínimo sob agitação, suplementado com óleo de soja, e o sobrenadante teve a sua atividade enzimática testada sobre *p*-nitrofenil palmitato (pNPP). Foram testadas 133 linhagens provenientes de diferentes substratos, e treze apresentaram uma atividade lipolítica significativamente alta em comparação com as demais ($p < 0,001$). Otimizações preliminares mostram condições ótimas de secreção da enzima produzida pela levedura selecionada, *Candida parapsilosis* QU110, em meios de cultura com pH inicial em torno de 6,0, contendo triptona e óleo de oliva como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. O extrato bruto (sobrenadante livre de células) apresenta estabilidade a surfactantes não-iônicos e *n*-hexano, mas não a etanol ou metanol. Condições ótimas de atividade da enzima, avaliadas pela metodologia de superfície de resposta, foram observadas a 36 °C e pH 8,0.

ABSTRACT

Lipases (E.C. 3.1.1.3) are serine-hydrolases, and act on long chain fatty acid ester bonds. They exhibit specific and enantioselective activities, and as such there is plenty of interest for industry. Microbial lipases are interesting for industry, because its ease of purification and high yields it permits. Several yeasts possess the ability of naturally produce these enzymes, allowing the fast production of non-transgenic lipases. This work aimed at evaluating lipase production in wild yeast strains and optimizing its production, as well as characterizing this enzyme. An initial screening was made on Tween 80 and oil-agar plates. Growing yeasts were then cultivated under agitation in oil-supplemented minimum medium, and the supernatant had its enzymatic activity tested over p-nitrophenyl palmitate (pNPP). One-hundred and thirty-three strains isolated from different substrates were tested, and thirteen showed significantly high lipolytic activity when compared to the others ($p < 0,05$). Preliminary optimization of lipase production by the selected yeast, *Candida parapsilosis* QU110, showed optimal enzyme secretion in media with initial pH 6.0, containing olive oil and tryptone as carbon and nitrogen sources, respectively. The crude extract (cell-free supernatant) showed stability against surfactants and n-hexan, but not against ethanol or methanol. Optimal enzyme activity conditions, evaluated through surface response methodology, were observed at 36 °C and pH 8.0.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A biocatálise

Enzimas são catalisadores que realizam rapidamente tarefas extremamente complexas em condições ambientalmente inofensivas e experimentalmente interessantes, e por isso têm atraído crescente atenção (Wong et al., 1994; Koeller et al., 2001). Possuem diversas características desejáveis em um reagente, tais como especificidade de reação, que gera produtos puros e de alto valor de mercado; alta eficiência catalítica, necessitando baixa energia de ativação, temperaturas amenas de operação e, portanto, baixo consumo energético; condições de pH em geral também brandas, reduzindo a necessidade do tratamento de efluentes por ácidos ou bases. As vantagens da biocatálise em relação à catálise química estendem-se ainda à variabilidade de reações que a biodiversidade permite. Ainda hoje a biodiversidade e seu potencial biotecnológico são subexplorados: apenas 2% dos micro-organismos já foram testados como fontes de enzimas. No entanto, já são conhecidos mais de 4000 tipos de enzimas, e o multibilionário mercado enzimático tem-se expandido cada vez mais (Sharma et al., 2001; Hasan et al., 2006). Em 2007, este mercado foi avaliado em US\$ 2,3 bilhões, e uma taxa de crescimento de 4% ao ano foi estimada em 2008 (Solazyme & Chevron).

Por todas estas razões, enzimas oferecem uma elegante solução para diversos problemas enfrentados atualmente, como degradação do ambiente, alterações climáticas, poluição ambiental, crise energética, entre outros. O

princípio da tecnologia “verde”, ou seja, otimizada para o menor impacto ambiental e melhor eficácia energética possíveis, encontra na biocatálise um denominador comum ao desenvolvimento econômico (Tabela 1), uma vez que tais princípios apresentam diversas vantagens econômicas (Tucker et al., 2006).

Tabela 1: Algumas vantagens ambientais e econômicas dos princípios da química “verde” (adaptado de Tucker, 2006)

Princípio	Vantagem ambiental	Vantagem econômica
Eficiência atômica	Formação mínima de subprodutos	Mais a partir de menos, incorpora-se no valor total dos materiais
Redução de solventes	Menos solventes, menos resíduos	Menos energia necessária
Otimização de reagentes	Uso de catalisadores, baixa estequiometria, reciclagem de reagentes	Mais eficiência e seletividade, menos desperdício.
Convergência	Menos consumo energético	Mais eficiência, menos operações
Redução energética	Menor consumo de energia, transporte, e uso de recursos.	Mais eficiência, processos mais curtos, condições brandas
Análise in situ	Reduz risco de exposição ou liberação no ambiente	Dados em tempo real agilizam a saída de produto e exigem menos retrabalho
Segurança	Materiais e processos inofensivos diminuem o risco de exposição, liberação, explosão e incêndios.	Mais segurança no trabalho e mais tempo em operação, menos medidas de controle especial

1.2 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas da classe das alfa-beta hidrolases, (devido a sua estrutura de dobramento), que catalisam a hidrólise e a síntese de triacilglicerol-ésteres e ácidos graxos. Sua estrutura típica (Figura 1) envolve uma tríade catalítica (Ser-His-Asp), e seu principal resíduo, serina, é em geral encontrado em uma sequência (Ser-X-His-X-Asp) (Jaeger et al., 1999; Reis et al., 2009). Lipases também agem sobre ácidos graxos livres, esterificando-os em

reações reversas de síntese ou esterificação. As reações realizadas por lipases estão esquematizadas na Tabela 2

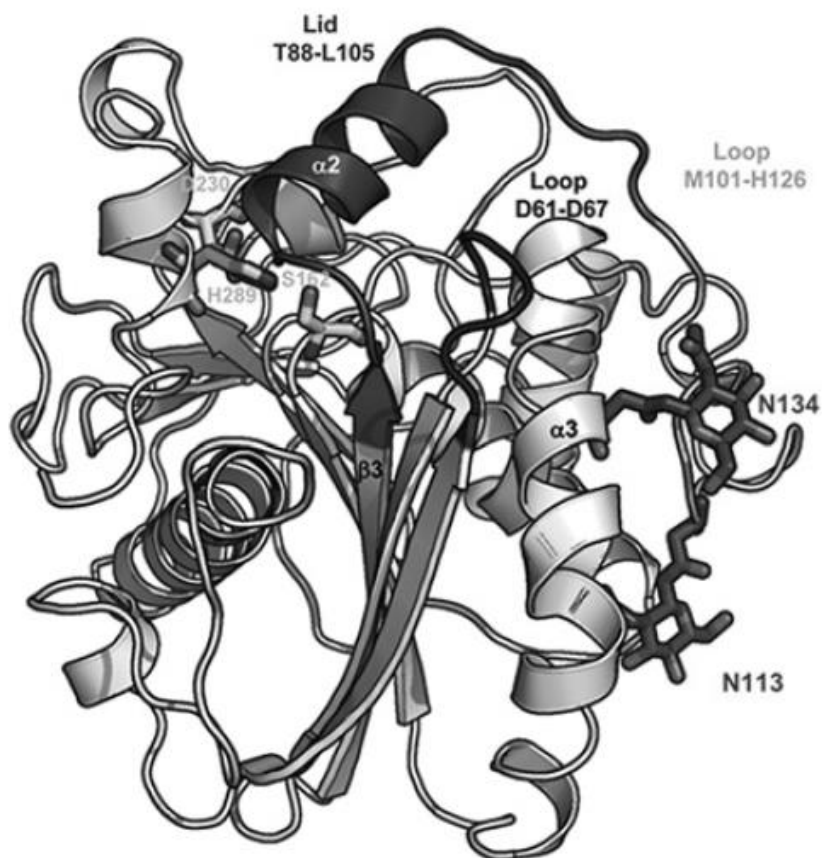


Figura 1: Estrutura tridimensional da lipase de *Yarrowia lipolytica*, indicando a estrutura de “tampa” (Lid), e a tríade catalítica (D230, H289 e S182). Reproduzido de Fickers et al. (2011).

Tabela 2: Reações catalisadas por lipases.

Atividade	Reagentes			Produtos			
Hidrólise	Triglicerídeo C_3R_3	+	Água $3x H-OH$	\leftrightarrow	Ácido Graxo $3x R-H$	+	Glicerol $C_3(OH)_3$
Transesterificação ou Alcoólise	Triglicerídeo $C_3R_1_3$	+	Álcool $3x R_2-OH$	\leftrightarrow	Éster $3x R(1)-R(2)$	+	Glicerol $C_3(OH)_3$
Interesterificação	Triglicerídeo 1 $C_3R_1_3$	+	Éster 1 $3x R_2-R_3$	\leftrightarrow	Éster 2 $C_3R_2_3$	+	Triglicerídeo 2 $3x R_1-R_3$

Lipases são distintas de outras esterases especialmente por sua atividade interfacial, conferida por uma "tampa" hidrofóbica ("Lid") que cobre o centro catalítico e impede que ela atue sobre substratos hidrossolúveis (Sarda & Desnuelle, 1958; Verger, 1997; Jaeger et al., 1997, 1999; Reis et al., 2009, Lopes et al., 2011). No entanto, há relatos de que lipases verdadeiras podem hidrolisar substratos tipicamente de esterases, ou seja, ésteres hidrossolúveis de cadeia curta, e o oposto também pode ocorrer (Lopes et al., 2011), dificultando a classificação atual.

Além do fato de atuar sobre lipídios, lipases possuem, como outras enzimas, propriedades quimicamente interessantes como a especificidade química, regioseletividade e enantioseletividade. Assim, uma ampla gama de aplicações é possível. Na síntese orgânica, lipases são empregadas na resolução de soluções racêmicas, gerando produtos enantiopuros. Também são aplicadas como detergentes e agentes emulsionantes, agindo na limpeza de papel e couro, e muita atenção tem sido dada à sua aplicação na transesterificação enzimática

de óleos e gorduras em biodiesel (Jaeger et al., 1999; Sharma et al., 2001, Hasan et al., 2006, Treichel et al., 2010). A Tabela 3 sumariza estas aplicações.

Tabela 3: Aplicações de lipases em alguns segmentos industriais (modificado de Sharma et al., 2011)

	Segmento	Ação	Produto ou aplicação
Alimentos	Produtos lácteos	Hidrólise de gordura do leite, cura de queijos, modificação de gordura de manteiga	Agentes flavorizantes em leite, queijos e manteiga
	Produtos panificados	Produção de flavorizantes	Aumento do tempo de prateleira
	Bebidas	Produção de aromas	Bebidas
	Molhos	Melhoria na qualidade, homogeneidade e sabores	Maionese, molhos e cremes
	Alimentos nutracêuticos	Transesterificação	Alimentos nutracêuticos
	Carnes	Desenvolvimento de sabores	Remoção de gorduras de carnes
Limpeza	Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos
	Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de manchas de óleo e gordura em tecidos
	Couro	Hidrólise	Curtumes e produtos em couro
	Papel	Hidrólise	Papel de maior qualidade
Química	Limpeza	Hidrólise	Remoção de óleos e gorduras
	Síntese química	Enantioseletividade, síntese	Unidades quirais, produtos químicos
	Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais, propriedades digestivas
	Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, hidratantes
	Combustível	Transesterificação	Biodiesel

Esta enzima é vastamente encontrada na natureza, mas lipases microbianas são as mais comumente aplicadas, uma vez que microrganismos as

secretam para o exterior, possibilitando elevados rendimentos de enzima, prontamente disponíveis para purificação ou direta utilização de extratos brutos (Sharma et al., 2011). Vários trabalhos mostram a ocorrência de leveduras naturalmente produtoras de lipase, especialmente dos gêneros *Candida* e *Yarrowia* (Dalmau et al., 2000; Fickers et al., 2003, 2004, 2005, De María et al., 2006; Zhao et al., 2011; Souza et al., 2012), embora outras espécies como *Pseudozyma hubeiensis* (Bussamara, 2010) sejam descritas. Diversos substratos, como alimentos, plantas e solo são fontes comuns desses organismos.

1.3 *Candida parapsilosis*

Candida parapsilosis é um fungo ascomicético, leveduriforme, diplóide, sem reprodução sexuada conhecida. Forma colônias claras, de morfologia variável, e possui células arredondadas, ovais a alongadas, formando ocasionalmente pseudomicélio (Laffey et al., 2005).

Sua distribuição é cosmopolita, sendo associada a diversos substratos, como maionese e molhos para salada (Pitt & Hocking, 2009), mel (Silva & Silva, 2009), queijos e leites caprino e bovino (Landell et al., 2006.; Spanamberg et al., 2009), “chicha” colombiana, uma típica bebida fermentada andina (López-Arboleda, 2010), solo e água (Carruba et al. 1991; Wang et al., 2007; Gadanho & Sampaio 2005).

Originalmente, o isolamento de *C. parapsilosis* ocorreu a partir de amostras clínicas de fezes, de um paciente acometido de diarreia, em Porto Rico, em 1928. Foi na época descrita como *Monilia parapsilosis*, para diferenciá-la de *Monilia psilosis*, atual *Candida albicans*. (Ashford, 1928 apud Trofa et al., 2008), e

posteriormente reclassificada como *C. parapsilosis* (Langeron & Talice, 1932 apud Nosek et al., 2009).

Inicialmente considerada não-patogênica, seu primeiro relato de patogenicidade ocorreu em 1940, a partir de um caso de endocardite aguda em usuário de drogas injetáveis (Joachim & Polayes, 1940). Atualmente, é considerado um patógeno emergente, devido a sua crescente vinculação a vários tipos de infecção (Weems 1992, Trofa et al., 2008).

Em 1995, Lin et al. propuseram a criação de subdivisões desta espécie, com base em dados fenotípicos e moleculares, segregando a espécie nos Grupos I, II e III. Com o passar dos anos, diversos trabalhos mostraram, através de técnicas como RAPD, sequenciamento da região ITS e de DNA mitocondrial, que esta espécie possuía uma grande variabilidade intraespecífica (Nosek, et al., 2009). Em 2005, Tavanti et al. descrevem, através de diversos métodos moleculares, a diferenciação dos subgrupos II e III em duas outras espécies: *C. metapsilosis* e *C. ortopsilosis*. Recentemente foi desenvolvido um método mais acurado e sensível de identificar as três espécies, com base na amplificação específica do intron RPS0 (Vercher et al., 2011).

Análises moleculares demonstram um grau de polimorfismo extremamente baixo para *C. parapsilosis*, observando-se um SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”, ou polimorfismo de apenas um nucleotídeo) a cada 15.553 bases. Este valor é considerado extremamente baixo, sendo 70 vezes menor que o observado em *Lodderomyces elongisporus* (Butler et al., 2009), espécie extremamente relacionada. Esta baixa variabilidade de sequências em *C.*

parapsilosis sugere que seja uma espécie recente, e que tenha divergido há menos de um milhão de anos, provavelmente a partir de *C. metapsilosis* (Fundyga et al. 2004).

Trabalhos de diversidade molecular (Kurtzman and Robnett 1997; Diezmann et al., 2004) demonstram a proximidade filogenética entre *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. ortopsilosis* e *Lodderomyces elongisporus* (Figura 2), pertencentes ao ramo “CTG” dos hemiascomicetos (Nosek et al., 2009)

A maquinaria celular dos organismos deste clado reconhece o códon “CUG” como serina, em vez de leucina, e os códons “UAG” e “UGA” frequentemente redundam em códons de terminação (Nakase et al. 1979; Suzuki et al. 1997). Estas características são importantes na medida em que, para a expressão heteróloga de genes oriundos destas espécies, é preciso realizar alterações da sequência clonada, conforme o organismo utilizado.

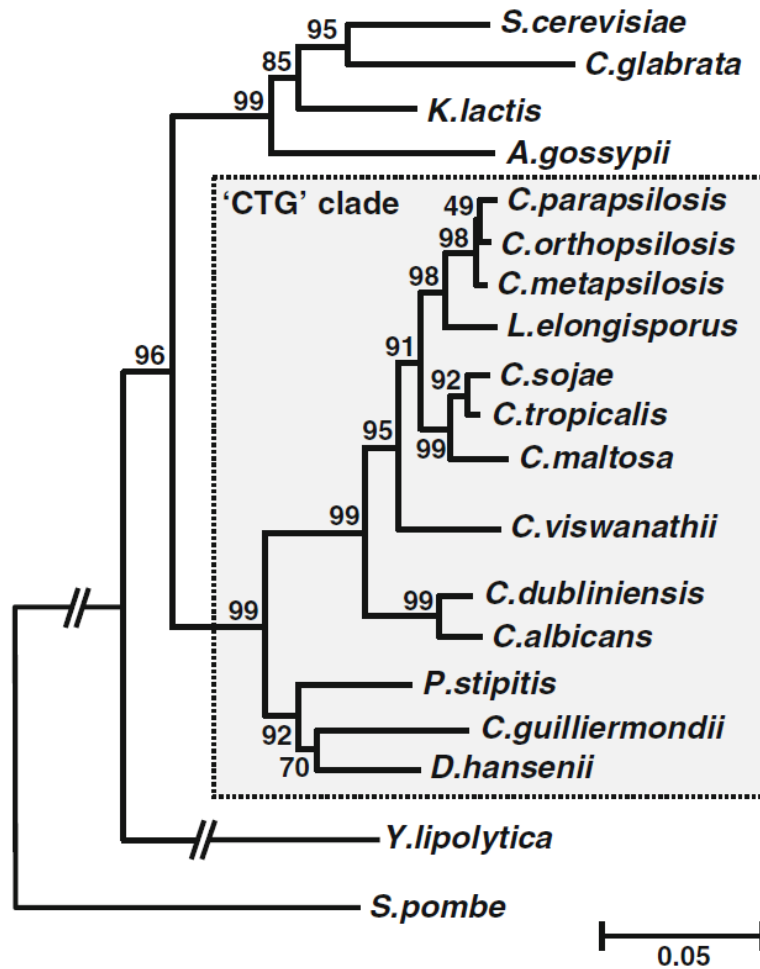


Figura 2: Árvore filogenética ilustrando espécies relacionadas a *C. parapsilosis*. Árvore construída a partir de seqüências do domínio D1/D2 da porção 26S do gene de RNA ribossômico, utilizando o método de neighbor-joining. Reproduzido de Nozek, 2009.

Análises comparativas demonstram que os códons ancestrais alterados nos genomas de *Candida* foram 99% substituídos funcionalmente, ou seja, quase todas as proteínas que possuem serina são codificadas corretamente, a partir de sequências de DNA alteradas (Butler et al., 2009).

A lipase de *C. parapsilosis* CBS 604, um isolado clínico, foi caracterizada por Neugnot et al., (2002) e propriedades não usuais foram descritas, especialmente a capacidade desta enzima, em meio aquoso, de catalisar a

transesterificação preferencialmente à hidrólise. Esta enzima encontra-se disponível sob a patente da BASF, e já foi utilizada com sucesso para transesterificação de biodiesel, alcançando rendimentos de até 97% quando utilizada em forma livre, e 40% quando imobilizada sendo, desse modo, reutilizada inúmeras vezes (Silva, 2011).

1.4 *Design* Fatorial de Plackett-Burman

Design fatorial é um delineamento experimental que envolve a combinação entre os níveis de dois ou mais fatores. O design de Plackett-Burman (Plackett & Burman, 1946) foi desenvolvido com objetivo de minimizar o número de experimentos necessários à escolha de fatores a serem otimizados em um processo, reduzindo custos e tempo dispendido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Dado o interesse em leveduras naturalmente produtoras de lipase, o objetivo deste trabalho foi encontrar uma levedura produtora desta enzima, otimizar suas condições de produção, e caracterizar as condições de atividade enzimática.

2.2 Objetivos Específicos

Bioprospecção de leveduras de coleção, bem como coleta de organismos potencialmente lipolíticos;

Otimização, em escala laboratorial, da produção desta enzima, através de experimentos univariados e delineamentos experimentais;

Caracterização da atividade enzimática do extrato bruto, verificando a estabilidade frente a diferentes compostos químicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Os reagentes eram todos de grau analítico, e estão listados no anexo 01.

3.2 Amostras

Amostras de solo e de folhas da Bromeliaceae *Tillandsia* sp. (Parque Farroupilha, Porto Alegre / Brasil) foram assepticamente coletadas em sacos estéreis, e um grama de solo ou cinco gramas de folhas foram adicionados a 100 mL de meio de enriquecimento líquido, composto de 2% óleo de soja, 1% peptona, 0,5% extrato de levedura, e mantido durante sete dias em agitador orbital a 150 rpm. Cinquenta microlitros de sobrenadante homogeneizado foram espalhados em placas de meio GYP – 1% glicose, 0,5% peptona, 0,3% extrato de levedura, 1% ágar, 0,04% cloranfenicol [pH 4,0]. Cada morfotipo observado foi isolado e purificado em placas de YM. Foram testados 15 isolados de bromélias e 10 isolados de solo. Também foram testadas 108 linhagens previamente isoladas, das quais 86 foram isoladas a partir de queijo (Landell et al., 2006), nove a partir de biomassa formada em tanques de diesel B4 (Bento, dados não publicados), duas de efluentes vinícolas (Mendes, dados não publicados), cinco do interior de folhas de bromélias (Landell, 2009), uma da superfície foliar de *Hibiscus rosa-sinensis* (Fuentefria, 2004), uma de águas mixohalinas (Bueno, 2010), uma de leite bovino (Spanamberg et al., 2009), e duas de resíduos gordurosos em restaurante (Ribas, dados não publicados). A lista completa dos organismos

testados, assim como seus substratos de isolamento originais, está na Tabela 4.

Todas as linhagens estão mantidas no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela 4: Linhagens utilizadas no estudo, e seus substratos de origem.

LINHAGEM	SUBSTRATO	LINHAGEM				SUBSTRATO	LINHAGEM	SUBSTRATO
IPIL06	Depósitos de Biodiesel	QU113	QU54	QU 116	QU140	Queijo	CE01	Filoplano de <i>Tillandsia sp.</i> (cultivo enriquecido)
IPIL07		QU114	QU55	QU 123	QU15		CE02	
IPIL10B		QU115	QU60	QU 132	QU15		CE03	
PETL10		QU117	QU64	QU 136	QU18C		CE04	
PETL13		QU119	QU67	QU 137	QU19		CE05	
PETL13B		QU120	QU68	QU 56	QU21		CE06	
PETL21		QU121	QU70	QU 57	QU22		CE07	
PETL26		QU122	QU71	QU 63	QU27		CE08	
PETL7		QU125	QU73	QU 77	QU28		CE09	
EB03	Endofítica de Bromélias	QU126	QU75	QU 91	QU29		CE10	
EB08		QU128	QU79	QU01	QU30		CE11	
EB11		QU129	QU80	QU03	QU33		CE12	
EB12		QU13	QU81	QU04	QU34		CE15	
EI01		QU130	QU82	QU06	QU35		CE16	
5B	Filoplano (<i>Hibiscus</i>)	QU131	QU84B	QU07	QU37		CE18	Solo (cultivo enriquecido)
LIM27	Água mixohalina	QU133	QU92	QU10	QU39		FA01	
LV102	Leite bovino	QU134	QU94	QU101	QU40		FA02	
CB1	Resíduos de gordura de restaurante	QU135	QU95	QU102	QU41		FA03	
CB2		QU138	QU96	QU103	QU42	FA04		
PF02	Efluente vinícola	QU139	QU98	QU104	QU47	FA05		
PF81		QU110	QU52	QU105	QU48	FA06		
				QU108	QU49	FA10		
						FA7		
						FA8		
						FA9		

3.3 Seleção preliminar

Todas as leveduras foram previamente cultivadas em placas de Ágar Tween 80 (Tween 80 0,5%, YNB 0,67%, agar 2%) e placas de Ágar-óleo (óleo de soja filtrado 0,5%; peptona 0,5%; ágar 1%). As linhagens capazes de mínimo crescimento em qualquer dos meios de cultura foram selecionadas para posterior teste de produção de lipase em meio líquido sob agitação.

3.4 Indução em meio líquido

Cem microlitros de uma suspensão de 10^6 células /mL em água destilada estéril foram inoculados em 100 mL de meio indutor (óleo de soja 2%, peptona 0,5%, sulfato de magnésio 0,01%, fosfato de potássio 0,1%), e cultivados em agitador orbital (Excella E24, New Brunswick, NJ, EUA) a 200 rpm durante 72h a 28 °C para a indução de lipase. Tanto o sobrenadante total quanto o sobrenadante livre de células foram utilizados no ensaio enzimático de *p*-nitrofenil palmitato (pNPP), conforme descrito abaixo.

3.5 Ensaio enzimático

Ensaio de pNPP foram realizados em triplicata, em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, contendo 0,11% goma arábica, 0,44% Triton X-100, e 10% solução pNPP, constituída de 3mg de pNPP/mL em 2-propanol, conforme Gupta et al. (2006). Foram aliqüotados 1,5 mL de sobrenadante em tubos de microcentrífuga. O sobrenadante com células foi utilizado diretamente foi adicionado à solução-substrato na proporção de 1:9 (v:v), e a reação conduzida por 1 h a 37 °C. O sobrenadante sem células foi centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos e adicionado

à solução substrato conforme acima. O produto liberado na hidrólise, *p*-nitrofenol (PNP), exibe cor amarela, que absorve luz no comprimento de onda 405-410nm. A absorbância foi então medida com espectrofotômetro a 410 nm (3000 Ultraspec - Pharmacia Biotech, AB, Suécia) ou com leitor automatizado de microplacas de 96 poços a 405 nm (ELx800 - Biotek Instruments Inc, VT EUA). Uma unidade de enzima equivale à liberação de 1 μmol de PNP $\times \text{min}^{-1}$. A curva padrão foi realizada com PNP no tampão acima descrito, e um controle positivo utilizando extrato bruto de cultivo celular indutor de *Pseudozyma hubeiensis* (Bussamara, 2010) foi incubado para verificar a estabilidade da solução-substrato. As absorbâncias observadas em ambos os aparelhos mostram variabilidade menor do que a observada entre réplicas reacionais ($P < 0,05$), demonstrando equivalência entre as leituras e confiabilidade nos resultados observados em ambos equipamentos.

3.6 Otimização univariada da indução da lipase da levedura selecionada

Inicialmente, diferentes pH iniciais (3, 6 e 9), fontes de nitrogênio orgânico (peptona e triptona) e fontes de carbono (óleos de soja e de oliva, Tween 20 e Tween 80) foram testadas a fim de verificar as condições ideais para a indução da produção de lipase. Com base nestes resultados preliminares, testes adicionais de pH (5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0) foram realizados usando o óleo de oliva e triptona como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente. As concentrações são as mesmas que acima, o pH inicial foi ajustado por HCl ou NaOH, conforme necessário, e não foi controlado durante o cultivo das leveduras. As reações de

lipase sobre pNPP foram realizadas tanto com o sobrenadante bruto (com células) quanto com o sobrenadante livre de células, com intuito de detectar lipases extracelulares e lipases ligadas à célula.

3.7 Otimização de indução por Plackett-Burman

O *design* fatorial particionado de Plackett Burman foi escolhido para testar a influência dos componentes indutores, e foram testadas 12 variáveis, a saber: pH (4 e 9), temperatura (25 e 30/35/40 °C), e presença/ausência de: óleo de soja 0,5%, óleo de oliva 0,5%, Tween 20 0,5%, Tween 80 0,5%, peptona 0,5%, triptona a 0,5%, extrato de levedura 0,5%, YNB% 0,67, sulfato de magnésio 0,01% e fosfato de potássio 0,1%.

A variação das temperaturas foi realizada em experimentos completos, em que apenas este fator foi alterado. A Tabela 5 mostra as condições testadas em cada conjunto experimental. A análise do design experimental foi realizada utilizando-se o software Statistica 7 (Hill & Lewicki, 2007). Todas as medições de lipase nesta etapa foram feitas com o sobrenadante livre de células. também em triplicata.

Tabela 5: Condições experimentais utilizadas no design experimental de Plackett-Burman para análise de indução lipolítica em *C. parapsilosis* QU110.

Run	Temperatura	pH	Peptona (%)	Triptona (%)	Extrato de Levedura (%)	YNB (%)	Óleo de Oliva (%)	Óleo de Soja (%)	Tween 80 (%)	Tween 20 (%)	Sulfato de Magnésio (%)	Fosfato de Potássio (%)
1	25 °C	3	0,5	0,5	0	0,67	0	0,5	0,5	0,5	0,01	0
2			0,5	0	0	0,67	0,5	0	0,5	0	0,01	0,1
3			0	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0,5	0	0,1
4			0	0	0,5	0	0	0	0,5	0,5	0	0,01
5		9	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,1
6			0	0,5	0,5	0,67	0,5	0	0,5	0	0,01	0
7			0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0
8			0	0	0,5	0,67	0	0,5	0	0,5	0,01	0,1
9	30 °C	3	0	0	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0,01	0
10			0,5	0,5	0,5	0,67	0	0	0	0,5	0	0
11			0,5	0	0,5	0,67	0,5	0,5	0	0	0	0,1
12			0	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0,01	0,1
13		9	0	0	0	0,67	0	0	0,5	0,5	0	0,1
14			0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0,01	0
15			0,5	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,01	0,1
16			0	0,5	0	0,67	0,5	0,5	0,5	0	0	0
17	37 °C	3	0	0	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0,01	0
18			0,5	0,5	0,5	0,67	0	0	0	0,5	0	0
19			0,5	0	0,5	0,67	0,5	0,5	0	0	0	0,1
20			0	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0,01	0,1
21		9	0	0	0	0,67	0	0	0,5	0,5	0	0,1
22			0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0,01	0
23			0,5	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,01	0,1
24			0	0,5	0	0,67	0,5	0,5	0,5	0	0	0
25	40 °C	3	0	0	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0,01	0
26			0,5	0,5	0,5	0,67	0	0	0	0,5	0	0
27			0,5	0	0,5	0,67	0,5	0,5	0	0	0	0,1
28			0	0,5	0,5	0	0,5	0	0,5	0,5	0,01	0,1
29		9	0	0	0	0,67	0	0	0,5	0,5	0	0,1
30			0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,5	0,01	0
31			0,5	0,5	0	0	0	0,5	0	0	0,01	0,1
32			0	0,5	0	0,67	0,5	0,5	0,5	0	0	0

3.8 Otimização da atividade enzimática

Um *design* fatorial de componente central foi elaborado no software Statistica 7, utilizando-se pH e temperatura como variáveis (Tabela 6). As reações foram realizadas conforme acima, utilizando-se o sobrenadante livre de células, variando-se as temperaturas de incubação e, conforme o pH usado, os tampões, que foram Tris-HCl 50 mM, para pH 7,5 ou acima, e citrato-fosfato 50 mM, para pH menores do que 7,5. Após a reação, o pH foi alterado para 8,0 para que a coloração do PNP fosse emitida

Tabela 6: Condições experimentais utilizadas no design fatorial por componente central na otimização da atividade enzimática do extrato bruto de *C. parapsilosis* QU110.

T °C	pH
25	6,00
49	6,00
25	10,00
49	10,00
37	3,50
37	14,14
15	8,00
59	8,00
37	8,00
37	8,00

3.9 Estabilidade da atividade enzimática

O sobrenadante livre de células foi co-incubado [concentração de 1:1 (v: v)] durante uma hora a 37 °C com diferentes sais, na concentração 50 mM (MgCl₂, KCl, CaCl₂, NaCl e EDTA), solventes (n-hexano, acetona e isopropanol a 20%, 50% e 80%; etanol 20%, 50% e 99,5%) e detergentes (SDS, Triton X-100 e

Tween 20, todos a 2%). Um controle foi realizado com água destilada na concentração 1:1 v:v. As atividades enzimáticas residuais foram medidas através do teste de pNPP acima mencionado, e comparadas com a atividade do controle negativo, considerada como 100%.

3.10 Identificação da levedura selecionada

A linhagem QU110 foi cultivada aerobicamente em caldo GYP (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5%) a 28°C. O DNA genômico total foi extraído e purificado a partir de 5 mL de cultura, conforme descrito por Osorio-Cadavid et al. (2009) O sequenciamento da região D1/D2 da subunidade 26S do DNA ribossômico foi realizado de acordo com Kurtzman & Robnett (1998), utilizando os oligonucleotídeos NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 min, anelamento a 55°C durante 30s, extensão a 72°C durante 1 min, e extensão final a 72 ° C durante 10 min. O produto da PCR foi purificado pelo método de precipitação de polietileno glicol (Lis, 1980), e seqüenciado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no MEGA BACE 1000 (Cbiot / UFRGS, Brasil). A seqüência foi alinhada e comparada com seqüências constantes no GenBank, usando a ferramenta de alinhamento BLAST.

3.11 Análise estatística

Os resultados da triagem inicial foram submetidos ao teste "t" de Student, com $P < 0,001$. Dados gráficos mostrados apresentam barra de erro correspondente a $P = 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Produção de lipase

Cento e trinta e duas linhagens foram testadas em placas com Ágar-Tween 80 e Ágar-Óleo, das quais, cento uma amostras observou-se crescimento positivo em ao menos um dos meios testados. Estas leveduras foram testadas em duplicata em meio líquido oxigenado e Suas atividades lipolíticas sobre *p*-NPP (Figura 3) foram comparadas usando o teste t de “student”.

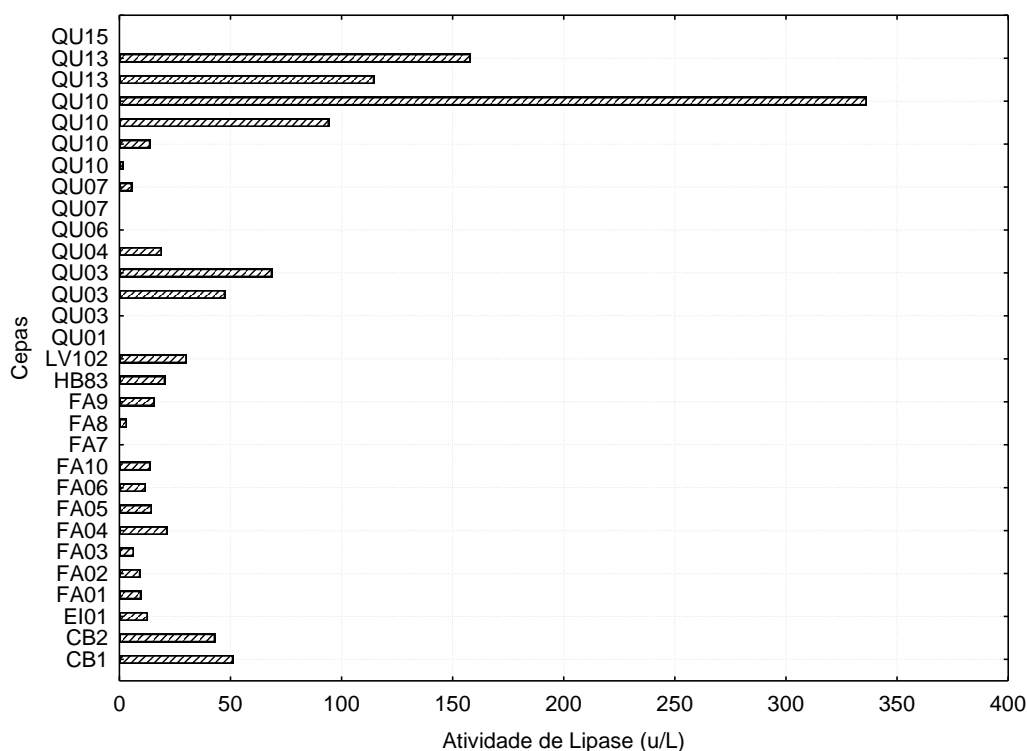


Figura 3: Gráfico de atividade enzimática das linhagens testadas em meio indutor sob agitação.

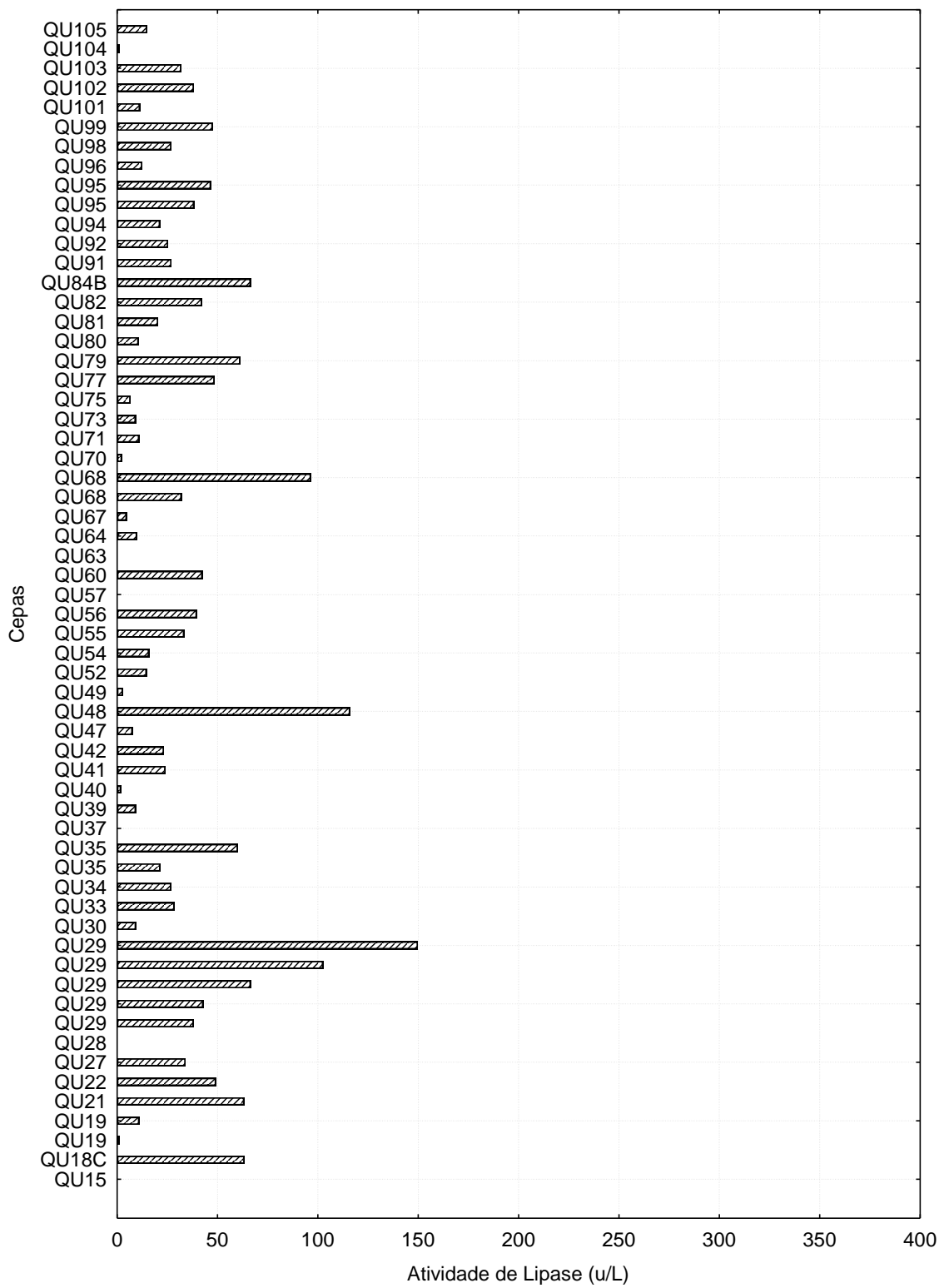


Figura 3 (Continuação): Gráfico de atividade enzimática das linhagens testadas em meio indutor sob agitação.

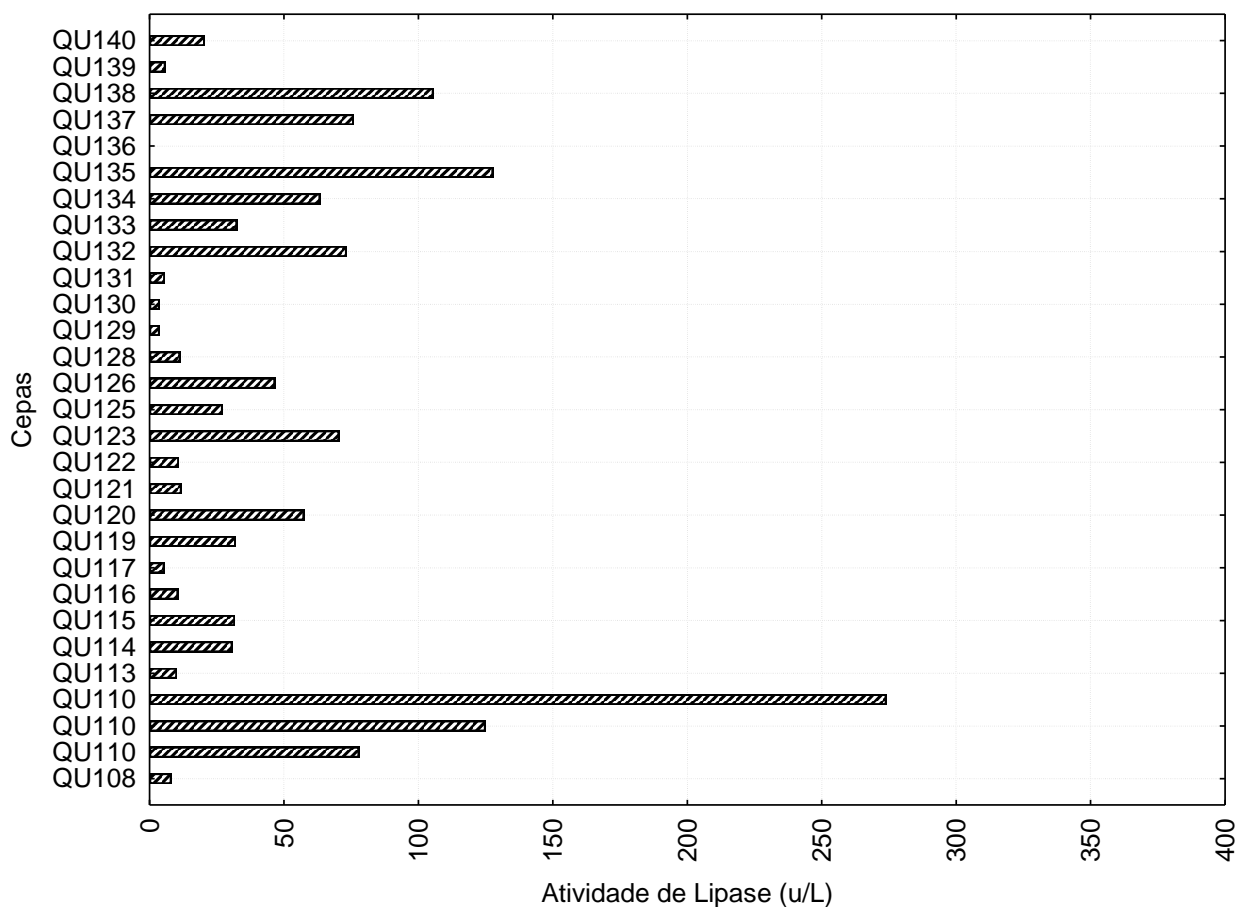


Figura 3 (Continuação): Gráfico de atividade enzimática das linhagens testadas em meio indutor sob agitação.

Onze linhagens (Figura 4) apresentaram maior atividade lipolítica do que a média, com $P < 0,001$, e a linhagem QU110 foi selecionada para a otimização da produção de lipase, devido a sua alta atividade de lipase, quando comparada com a média, e coerência entre as repetições.

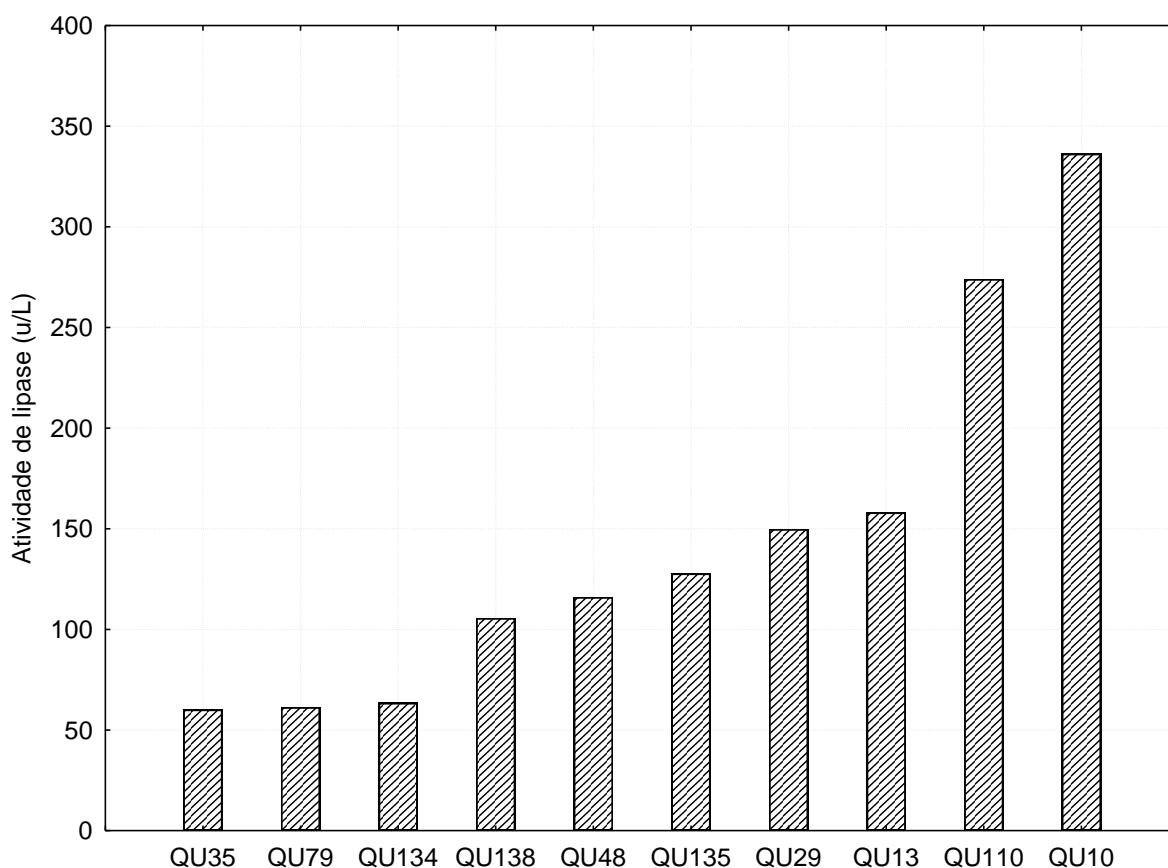


Figura 4: Valores de atividade lipolítica das melhores linhagens testadas.

A linhagem QU110 foi isolada a partir de uma amostra de queijo artesanal Caccio Cavallo (Landell et al., 2006), e foi identificada como *C. parapsilosis* por sequenciamento da região D1/D2 do rDNA 26S. Dados de alinhamento mostram 99,9% de identidade com a linhagem-tipo *C. parapsilosis* CBS 604, e subsequentes alinhamentos foram realizados contra sequências de *C. metapsilosis* e *C. ortopsilosis*, confirmando a identidade da linhagem.

O efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lipase pode ser visto na Figura 7. *C. parapsilosis* QU110 mostrou produção de lipase de 47,97 u/L na presença de óleo de oliva, mais de dez vezes a atividade observada na

presença de óleo de soja, tween 20 ou tween 80. No entanto, o sobrenadante livre de células mostrou atividade de lipase de apenas 9,23 u/L.

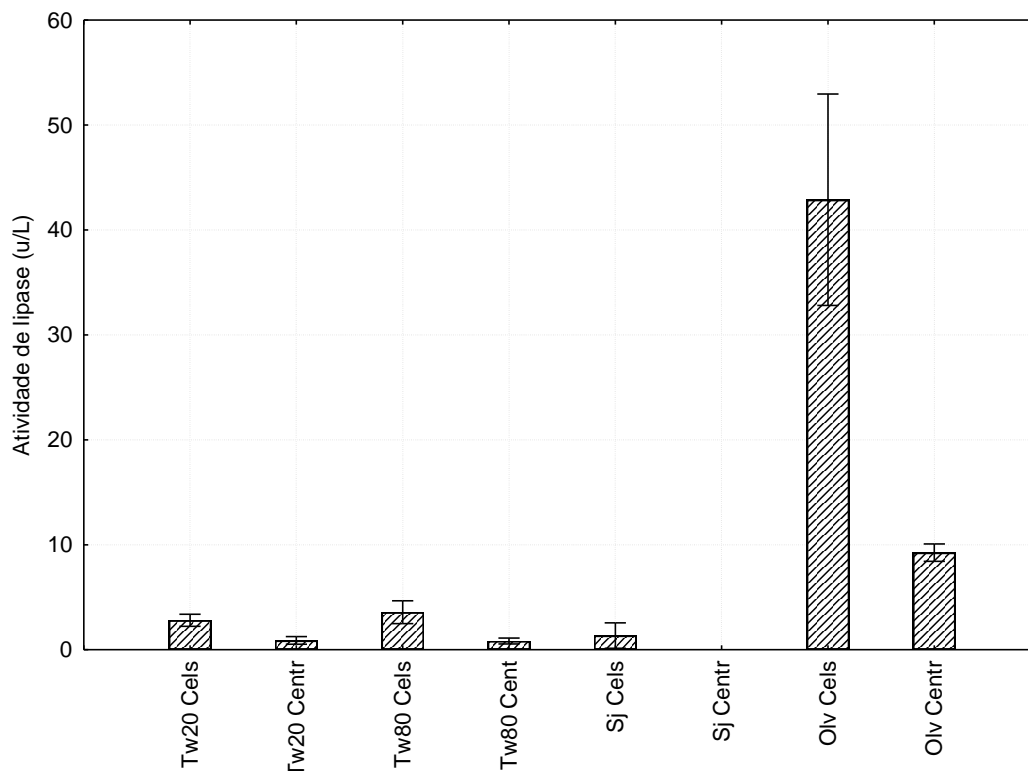


Figura 5: Efeito da fonte de carbono sobre a produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. Tw20: Tween 20 0,5%; Tw80: Tween 80 0,5%; Sj: óleo de soja 0,5%; Oliv: óleo de oliva 0,5%; Cels: sobrenadante bruto com células; Centr: sobrenadante centrifugado.

Triptona foi a fonte de nitrogênio que mais influenciou a produção de lipase em pH 6,0, induzindo uma atividade de 47,02 u/L no sobrenadante bruto, e 36,98 u/L no sobrenadante livre de células (Figura 6). Duas marcas de triptona foram usadas (Himedia e Organochemie), gerando induções diferentes: enquanto a primeira tenha induzido produção de lipase extracelular, a última induziu produção de lipase detectável apenas no sobrenadante bruto com células.

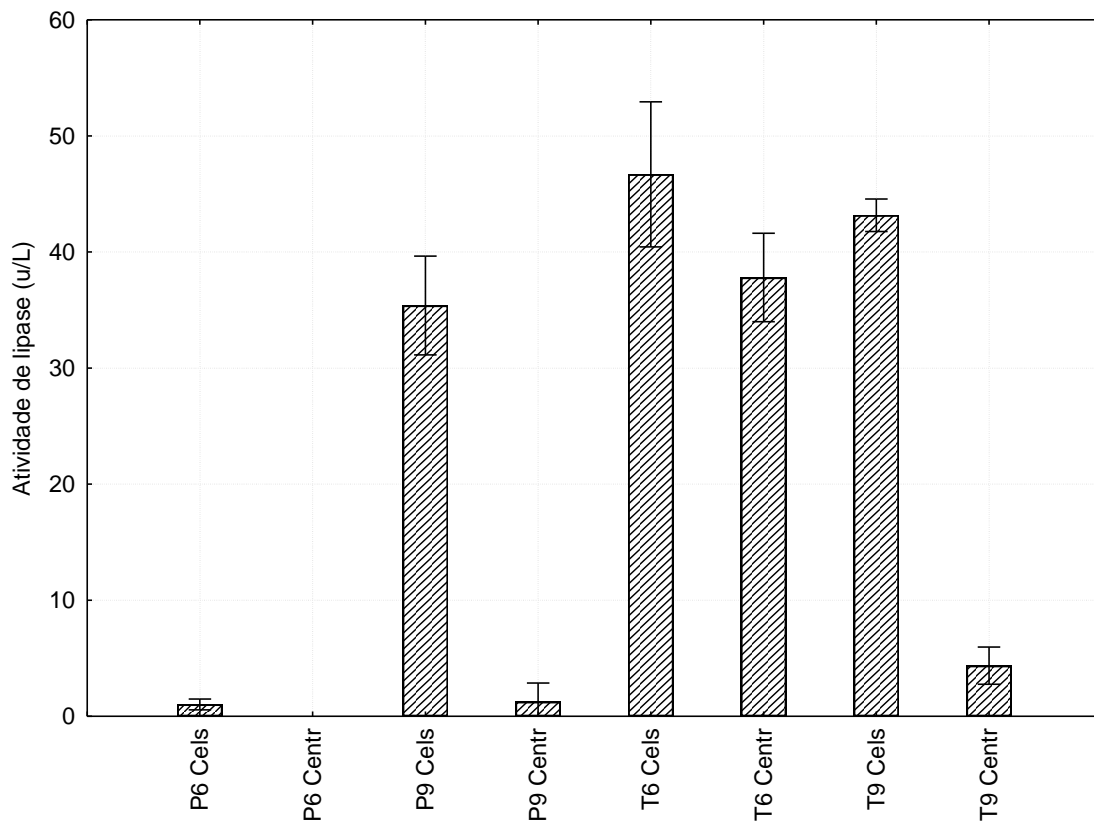


Figura 6: Efeito do pH e da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. P: peptona 0,5%; T: triptona 0,5%; 6/9: pH inicial; Cels: sobrenadante bruto com células; Centr: sobrenadante centrifugado livre de células.

Foi observado que em pH 9,0 a indução de produção de lipase foi mais baixa (43,01 u/L), e observada apenas no sobrenadante com células, não sendo observada secreção de lipase. Além disso, testes subsequentes indicam que há indução de secreção da lipase por triptona, em pH 5-6,5 (dados não mostrados). A ausência de secreção de lipase em pH 9,0 também foi observada utilizando-se peptona como fonte de nitrogênio, enquanto houve um aumento de atividade lipolítica no sobrenadante com células (31,05 u/L), em comparação ao pH 6,0.

Os resultados acima mencionados enfatizam a inter-relação entre as variáveis que podem influenciar a produção de lipases, razão pela qual um

delineamento experimental de Plackett Burman foi realizado. O gráfico de Pareto resultante deste delineamento (Figura 7) indica a contribuição positiva de Tween 20 e de YNB à indução de produção de lipase, embora não estatisticamente significativa. Este resultado foi obtido analisando-se os três subconjuntos experimentais (com variação de temperaturas).

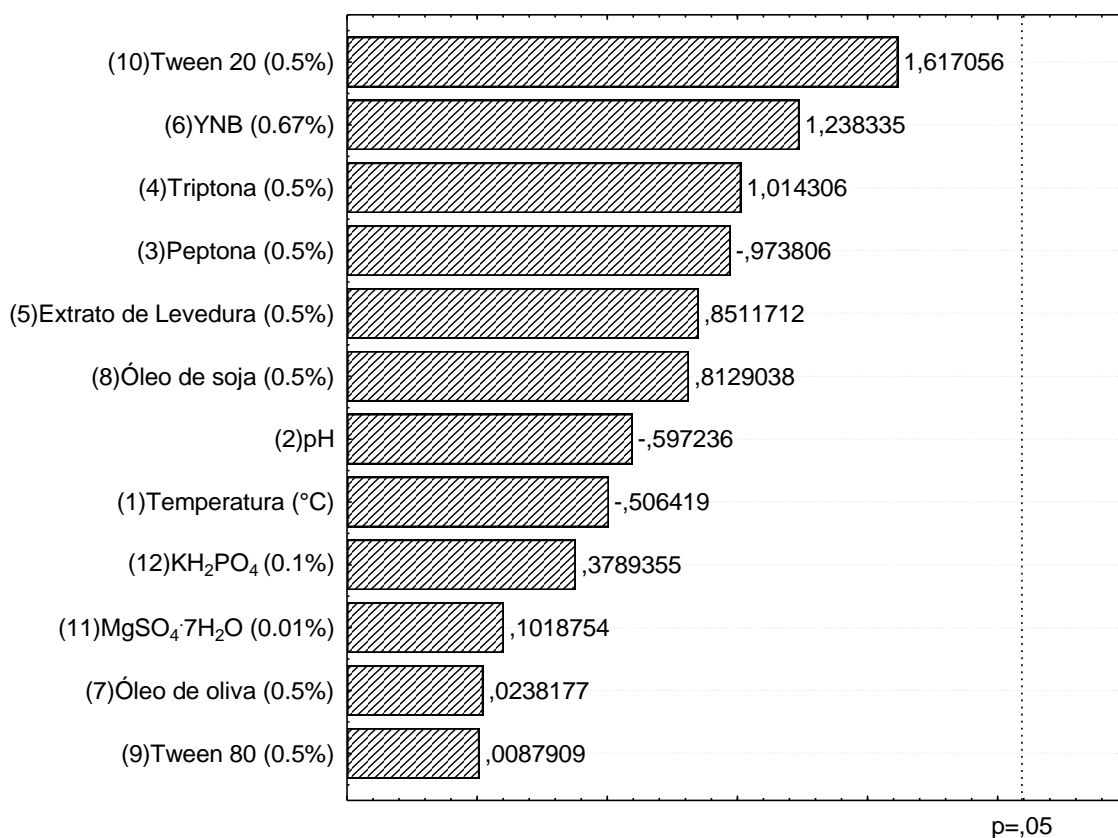


Figura 7: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. Temperaturas testadas de 25, 30, 35 e 40 °C.

Os gráficos de Pareto individuais para cada uma das três temperaturas superiores constam nas Figuras 10, 11 e 12. Como não houve nenhuma variável com uma contribuição estatisticamente significativa para a produção de lipase (para $P=0,05$), não foi possível gerar uma superfície de resposta informativa.

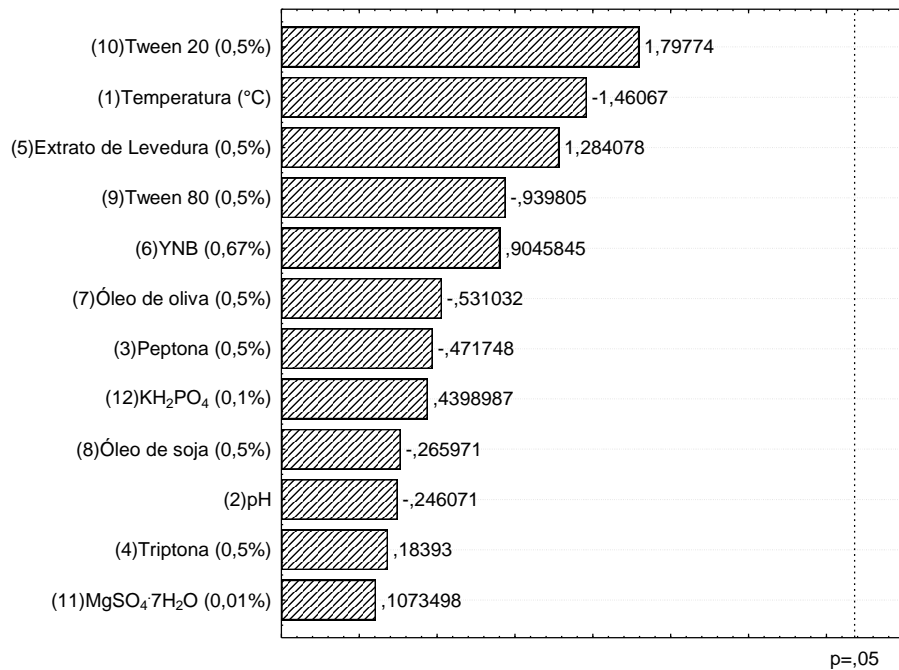


Figura 8: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. Temperaturas de 25 e 30 °C.

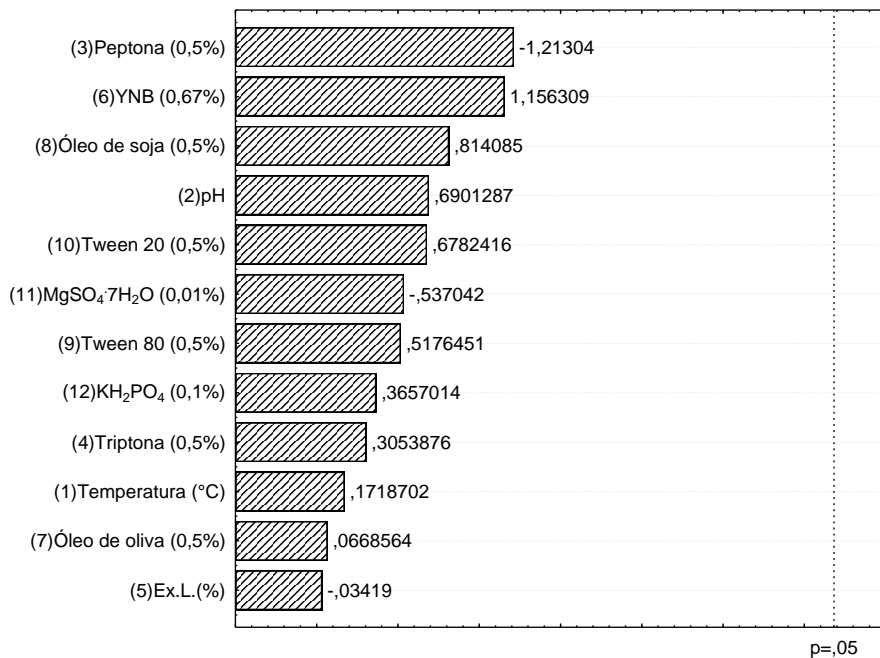


Figura 9: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. Temperaturas de 25 e 35 °C.

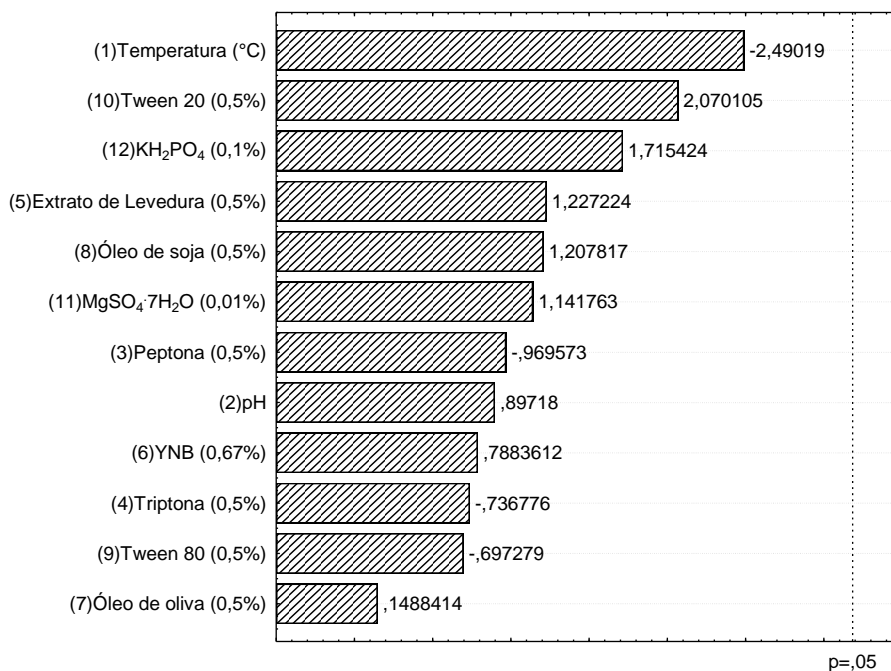


Figura 10: Gráfico de Pareto indicando contribuições individuais de diversos fatores à produção de lipase pela levedura *C. parapsilosis* QU110. Temperaturas de 25 e 40 °C.

4.2 Caracterização enzimática

Para caracterizar as melhores condições para atividade da lipase de *C. parapsilosis* QU110, foi realizado um *design* fatorial de componente central e gerada uma superfície de resposta (Figura 11). As melhores condições de atividade foram pH 8,0 e temperatura de 36 °C, embora o modelo preveja uma faixa de ação mais ampla.

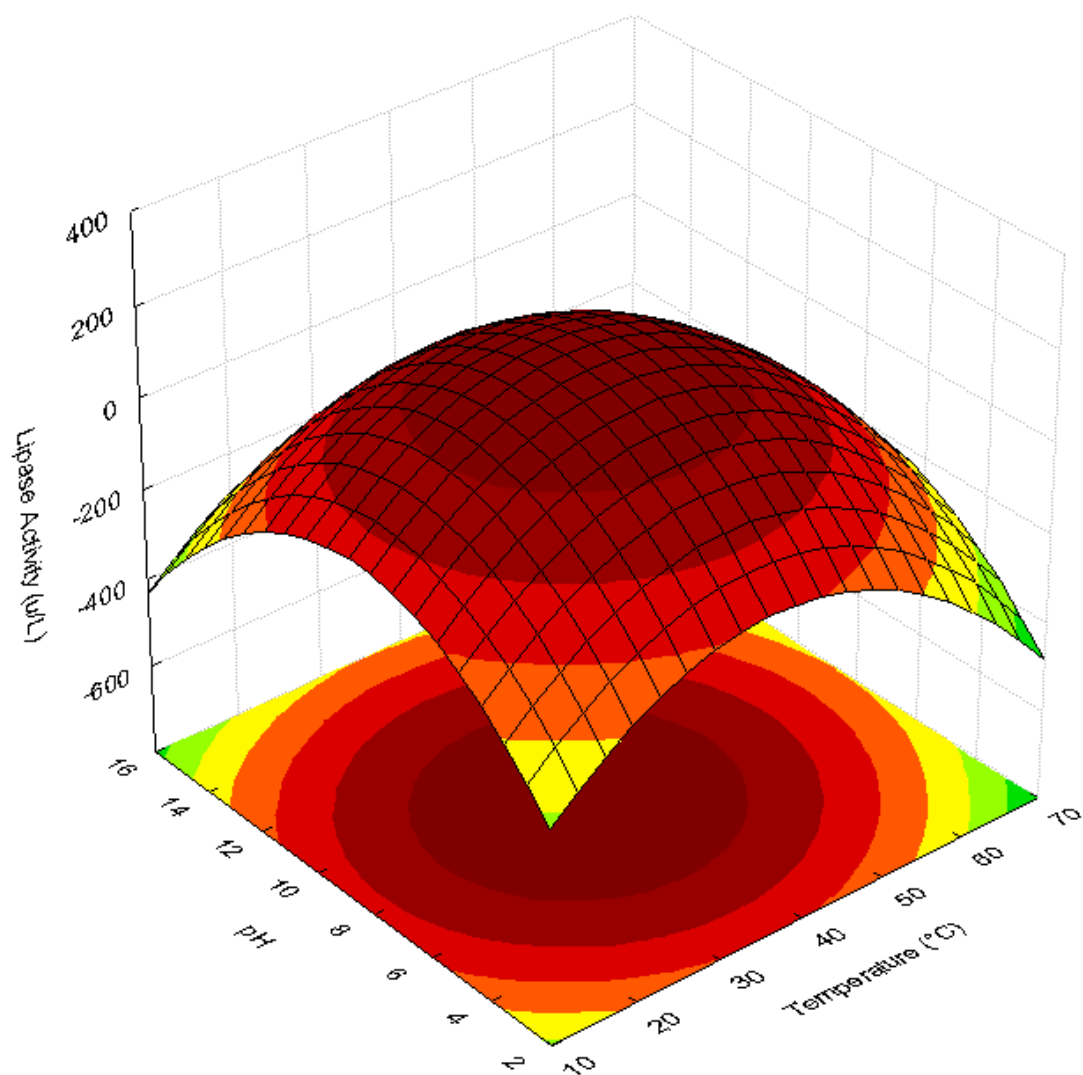


Figura 11: Atividade enzimática sobre *p*-nitrofenil palmitato, frente à variação de pH e temperatura. Superfície de resposta do extrato livre de células.

O sobrenadante livre de células mostrou boa estabilidade a surfactantes não-iônicos, retendo até 80% da atividade na presença de Tween 80 (Figura 12).

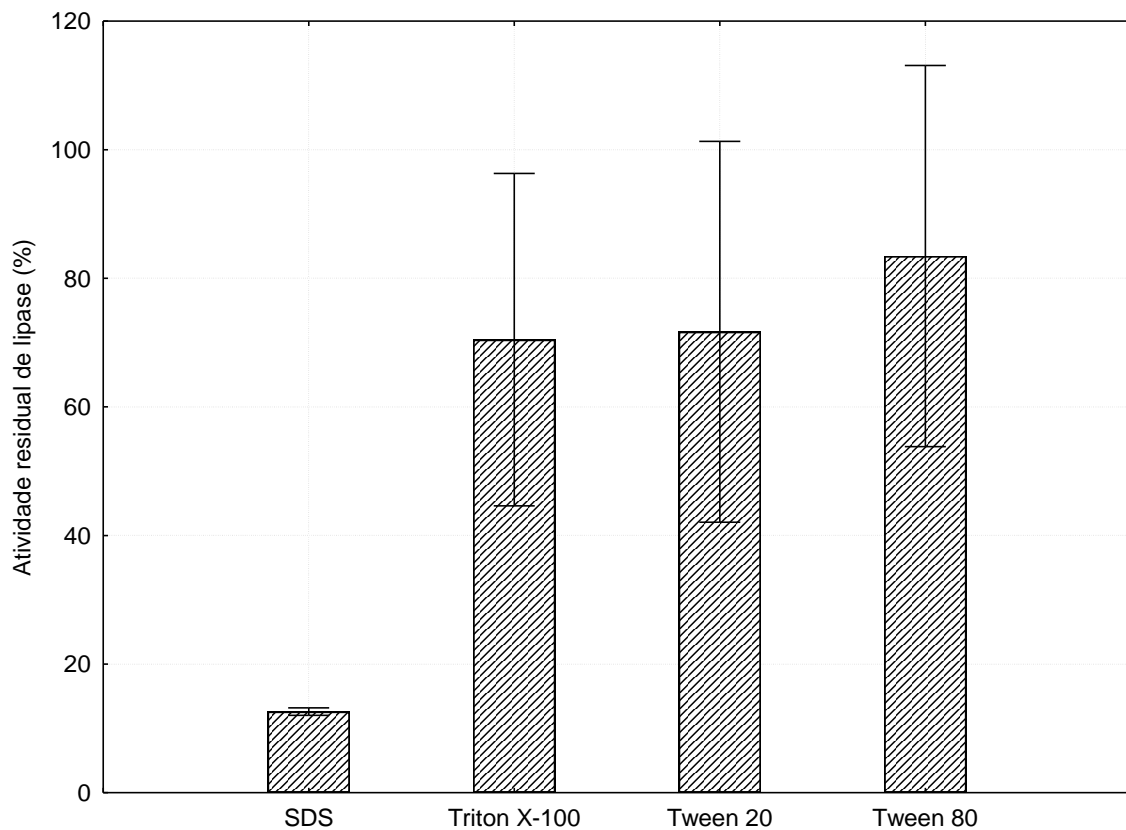


Figura 12: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diferentes surfactantes.

Íons mono e divalentes parecem desestabilizar a enzima (

Figura 13), que mostrou atividade residual inferior a 40% quando tratada com CaCl_2 , e próxima a 50% com MgCl_2 , KCl, NaCl e EDTA. A maioria dos solventes mostrou forte inibição e desestabilização da lipase, especialmente quando concentrados. No entanto, a co-incubação com n-hexano 80% aumentou a atividade da lipase em cerca de 5% (Figura 14).

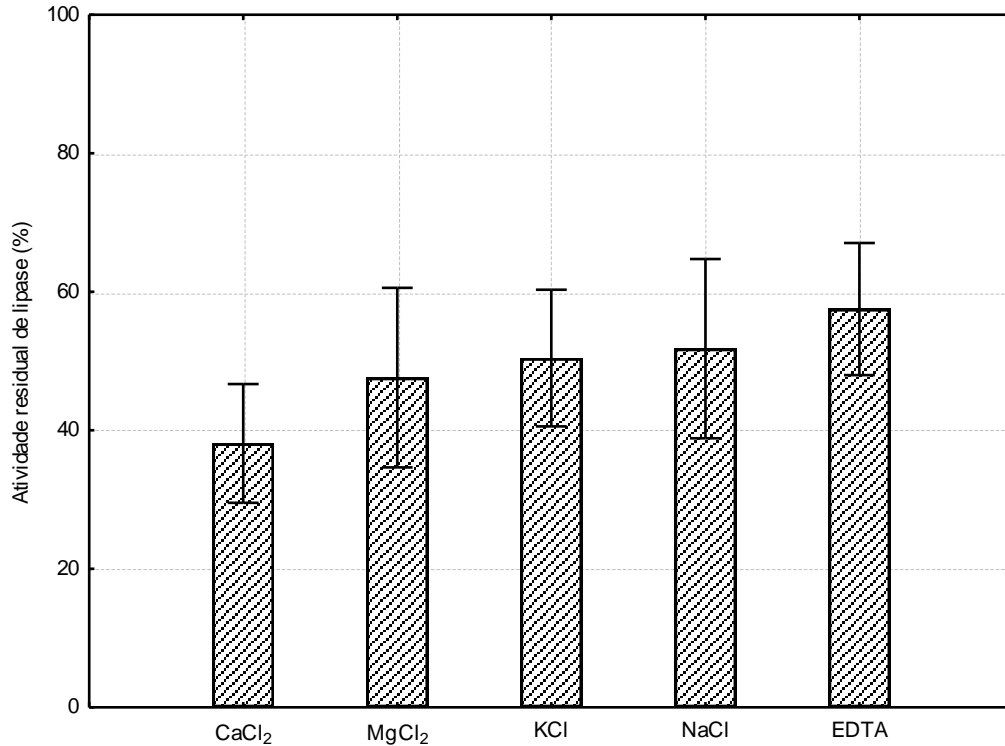


Figura 13: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diferentes sais.

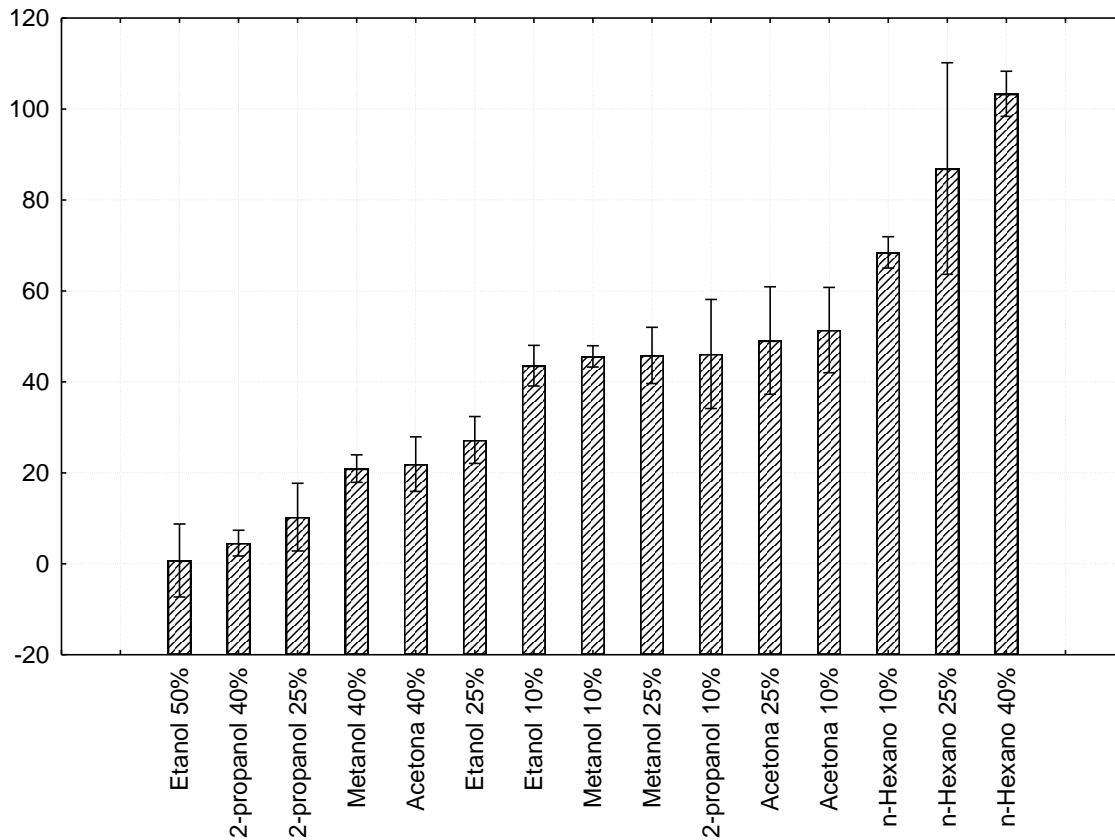


Figura 14: Atividade residual de lipase após 1 hora de co-incubação do extrato livre de células com diversos solventes em diferentes concentrações.

5. DISCUSSÃO

A etapa preliminar, realizada com linhagens oriundas de diferentes substratos evidenciou que, embora a produção de lipase seja comum, linhagens de leveduras selvagens apresentam produção mais baixa. De acordo com isso, Fickers et al. (2003) em trabalho de mutação de linhagem selvagem de *Yarrowia lipolytica* relatam que a linhagem original, CBS6303, tinha baixa atividade lipolítica, entre 10 e 100 u/L. No entanto, após mutações químicas aleatórias, induzidas por N-metil-N-nitro-N-nitroguanidina (NTG), os autores alcançaram valores de indução de até 174.400 u/L, com a linhagem mutante LgX64.81. Essa indução foi validada em Ágar Tributirina com óleo de oliva e em testes com p-nitrofenil butirato, bem como através da expressão do gene repórter beta-galactosidase, expresso sob regulação do promotor do gene da lipase da linhagem mutante LgX64.81. Como todas as linhagens selvagens testadas no presente trabalho apresentaram baixas atividades de lipase em comparação a relatos da literatura, nossa abordagem de triagem centrou-se na comparação entre as linhagens deste estudo.

As leveduras que apresentaram maior atividade da lipase do que a média de todas as linhagens testadas foram selecionadas como potenciais boas produtoras de lipase. A atividade de lipase foi avaliada em duplicata para cada linhagem, e *C. parapsilosis* QU110 foi selecionada para otimização da produção e caracterização de atividade enzimática

Embora lipases extracelulares sejam diretamente liberadas ao meio externo, possibilitando seu uso direto ou uma purificação simplificada, lipases aderidas à célula também oferecem possibilidades interessantes, uma vez que a retirada de matéria celular implica retirada também do catalisador, permitindo reciclagem e reuso deste. Esta abordagem já é empregada tanto em fungos quanto em bactérias (Matsumoto et al., 2001, Narita et al., 2006; Fukuda et al., 2008; He et al., 2008)

Diversos trabalhos empregam diferentes técnicas para demonstrar atividade enzimática em sobrenadantes livres de células, com objetivo de detectar lipases extracelulares, e em sobrenadantes contendo células, com objetivo de detectar lipases aderidas à célula (Hasanah, 1990; Hlavsová et al., 2009; Sun et al.; 2009) . Assim, no presente trabalho foram realizados ensaios de pNPP utilizando tanto sobrenadantes com células quanto sobrenadante livres de células.

Sabe-se que a produção de lipase é fortemente influenciada pelas condições do meio de cultura, modulando a sua secreção (Destain et al., 1997; Pereira-Meirelles, 1997; Dalmau et al., 2000; Fickers, 2003, 2005; Alonso et al., 2005; Wang et al., 2007; Turki et al., 2009), e nossos resultados reforçam este conhecimento.

A linhagem mutante *Yarrowia lipolytica* LgX64.81, que teve inativada a repressão de sua via catabólica, não mostrou produção de lipase na presença de fontes minerais de nitrogênio (Fickers, 2003; 2004; 2005), e apresentou indução de produção de lipases por triptona e ácido oléico. Tanto triptona e óleo de oliva,

que apresenta alto teor de ácido oléico, foram bons indutores da produção de lipase por *C. parapsilosis* QU110.

Até mesmo variações sutis na composição do meio, tais como as diferentes marcas de triptona utilizadas neste trabalho, podem afetar a produção de lipase e/ou secreção. Isto também foi relatado por Turki et al. (2009), ao mostrar que diferentes preparados enzimáticos de diferentes fontes de proteína podem induzir diferencialmente a produção de lipase na mesma linhagem de *Y. lipolytica*.

O efeito da fonte de nitrogênio sobre a produção de lipase foi também bastante influenciado pelo pH do meio. Embora triptona tenha induzido secreção de lipase em pH 6,0 (atividade enzimática no sobrenadante livre de células), o mesmo não ocorreu no pH 9,0, quando a maior atividade lipolítica foi observada no sobrenadante com células. A produção de lipase com peptona foi muito pequena em pH 6,0, enquanto o sobrenadante com células em pH 9,0 mostrou atividade de lipase. Assim, pH 9,0 induziu a produção de lipase com ambas as fontes de nitrogênio, embora aparentemente iniba a secreção de lipase. Nenhuma fonte de minerais, incluindo YNB, foram capazes de induzir a atividade de lipase (dados não mostrados)

Uma possível explicação para o efeito do pH no padrão de atividade lipolítica da levedura *C. parapsilosis* QU110 é a influência de diferentes pHs sobre a secreção da enzima. Deste modo, a secreção de lipase seria inibida por condições alcalinas, e assim a lipase permaneceria apenas ligada à célula, explicando a presença de atividade enzimática no sobrenadante com células em pH 9,0 mas não no sobrenadante livre de células. Neste sentido, desconhecemos

relatos até o presente momento que comprovem essa suposição. Wang et al. (2007) relatam que *C. parapsilosis* 3eA2, uma levedura isolada de água do mar, produziu lipase aderida à célula, mas não lipase extracelular. As condições de produção incluíam óleo de oliva como fonte de carbono e meio neutro, de pH 7,0. A levedura *C. parapsilosis* QU110 não apresentou lipases extracelulares a partir de pH 7,0, em concordância com este trabalho.

Uma explicação alternativa seria que duas diferentes lipases (uma aderida à célula, e outra extracelular) são produzidas nos diferentes pH. Em conformidade com esta hipótese de duas enzimas, Neugnot et al. (2002) e Briand et al. (1995) relataram dois genes de lipase em *C. parapsilosis* CBS 604, linhagem-tipo da espécie, um isolado clínico. Foi sugerido que uma destas lipases fosse expressa de modo truncado, ou que estas duas lipases possuem propriedades bioquímicas semelhantes, uma vez que não foi possível discriminá-las em gel bidimensional. A comparação foi realizada com a enzima expressa de forma nativa, na linhagem selvagem, e também expressa de forma heteróloga, em *Saccharomyces cerevisiae* (Neugnot, 2002). O presente estudo traz subsídio para contribuir com a hipótese de que as duas enzimas possam estar sendo expressas corretamente, porém com características semelhantes, uma vez que apenas a lipase extracelular foi analisada no referido trabalho.

Embora pouco ainda se saiba sobre os mecanismos de secreção de lipase em fungos, sabe-se que a parede da célula fúngica é uma estrutura dinâmica e complexa, e além de açúcares e glicoproteínas, pode conter várias proteínas e enzimas (Nimrichter et al., 2005). Neste contexto, é plausível que lipases sejam

encontradas associadas à parede celular, tanto de modo fixo quanto transitoriamente, passando através dela, logo antes da secreção

Stránský et al. (2007) mostraram diferentes condições para induzir lipases extracelulares e aderidas à célula, em *Geotrichum candidum* 4013, e Pereira-Meirelles et al. (2000) demonstra que, em *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50.682, a secreção de lipase é dependente da fase de crescimento, com atividade extracelular encontrada na fase estacionária tardia, enquanto a fase logarítmica tardia apresenta atividade de lipase no sobrenadante com células.

Uma vez que diferentes pH ocasionam alteração no comportamento das leveduras, os diferentes comportamentos encontrados em *C. parapsilosis* QU110 podem também estar relacionados à fase de crescimento, embora todas as medições de atividades de lipase tenham sido realizadas após o mesmo tempo de incubação (72h).

Embora nenhum fator tenha sido estatisticamente significativo nos testes de Plackett Burman, há uma tendência de que Tween 20 e YNB tenham contribuição positiva à produção de lipase, embora experimentos univariados realizados anteriormente com esses elementos não induzissem tal produção (dados não mostrados).

Planejamentos experimentais fatoriais particionados, como o de Plackett-Burman, induzem uma associação muitas vezes indesejável entre variáveis. O resultado final evidencia não apenas a contribuição individual dos diversos fatores, mas também o efeito das interações entre estes fatores. Assim, diversas hipóteses podem ser levantadas para explicar a incongruência entre as

tendências observadas nos testes de Plackett Burman e os testes univariados. Por exemplo, por ser uma fonte completa de minerais e vitaminas, YNB pode ter atuado como um suplemento nutricional às fontes orgânicas de nitrogênio, ao invés de atuar como única fonte como nos testes univariados. Assim, causaria um efeito positivo na indução de produção de lipase apenas quando utilizado em conjunto com outras fontes orgânicas de nitrogênio, sem possuir qualquer efeito quando utilizado como única fonte de nitrogênio. Do mesmo modo, tween 20 não era uma boa fonte de carbono indutora quando utilizada sozinha, mas pode ter causado uma leve emulsão do(s) óleo(s) presente(s) no meio, aumentando a área de contato das células com a fonte indutora e favorecendo a indução de lipase, ou ainda causando maior secreção de lipase por aumentar a permeabilidade da membrana e liberando a enzima antes aderida. Esta indução é demonstrada em *Y. lipolytica*, de modo que concentrações moderadas de Tween 80 (2%) aumentam sensivelmente a atividade de lipase (Corzo & Revah, 1999, Amaral, 2007)

Briggs (2011) mostra que os delineamentos de Plackett Burman podem de fato confundir as contribuições individuais e efeitos sinérgicos, especialmente quando muitos efeitos são analisados de uma só vez. Wu & Hamada (2009 apud Briggs, 2011) também ressaltam que a desvantagem de delineamentos como este, que reduzem o número de experimentos a um número mínimo, é justamente a introdução de complexas associações para o modelo, gerando frações de efeitos associados um ao outro e que não podem ser individualizados, causando assim dificuldades de análise. Isto pode ter ocasionado a falta de significância nos nossos resultados, uma vez que 12 fatores foram simultaneamente avaliados.

Embora trabalhos anteriores relatem condições levemente ácidas para os testes de atividade da lipase de *C. parapsilosis* (Briand et al., 1995; Brunel et al., 2004; Neugnot et al., 2002), poucos tentam otimizar essas condições. Wang et al. (2007) mostram pH 7,5 como ideal para a atividade de lipase aderida de *C. parapsilosis*, mas não relatam lipases extracelulares. Otimização de atividade e caracterização de enzimas são comuns em artigos que tratam de lipases de outros organismos. Em lipases de *Y. lipolytica*, por exemplo, pH ótimos entre 6 e 7,5 são relatados, embora em pH 4,0 já se tenha demonstrado a manutenção de sua atividade específica, e a temperatura ótima de atividade já foi descrita alcançar até 55 °C (Corzo e Revah, 1999; Destain, 1997, Pereira-Meirelles, 1997).

Com relação a *Candida rugosa*, três formas (Lip A, Lip B e Lip C) foram descritas, com temperaturas ótimas de 35-40 °C. Os pH ótimos foram observados como 7,0 para Lip A, 7,0-7,5 para Lip C e 7,5-8,0 para Lip B. (Benjamin & Pandey, 2000). Todas as três formas mostram proximidade com o pH ótimo e gamas de temperaturas semelhantes ao mostrado para a lipase de *C. parapsilosis* QU110.

As características de estabilidade observadas parecem concordar com outras lipases, mostrando estabilização por n-hexano e instabilidade para os solventes e surfactantes iônicos (Shah et al., 2003; Nie et al., 2006; Bussamara et al., 2010). Acetona 10% e 25% mostram desestabilização de cerca de 50%, menos do que outros solventes testados, o que concorda com relatos de sua utilização para a preparação de células para a interesterificação (Nakashima et al., 1989) e de biocatalisadores de células inteiras (Essamri et al., 1998).

Lipases aderidas são foco de diversos estudos, pois agem como biocatalisadores de célula inteira, apresentando diversas vantagens, especialmente em aplicações relacionadas a biodiesel (Fukuda et al., 2001, Hama et al., 2004; He et al.; 2008; Fukuda et al., 2009). *C. parapsilosis* já foi encontrada em mel (Silva & Silva, 2009), que é um ambiente com baixa atividade de água, devido à alta concentração de açúcares, o que leva a crer que esta levedura é capaz de tolerar baixas atividades de água, necessárias à transesterificação do biodiesel. É sabido também que a lipase de *C. parapsilosis* possui propriedades de transesterase em meio aquoso (Destain et al., 1997; Neugnot et al., 2002), e sua lipase já foi utilizada para transesterificação com alta eficiência. Em conjunto, estas propriedades tornam esta linhagem muito interessante para exploração em aplicações biotecnológicas.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho fica demonstrado que *C. parapsilosis* QU110 é induzida, em diferentes condições, a produzir lipases que podem ser secretadas ou aderidas à célula, e um modelo de superfície de resposta sugere uma ampla gama de condições ótimas de pH e Temperatura para a atividade de lipase.

Como perspectiva de prosseguimento do estudo, pretende-se realizar estudos específicos de localização enzimática, e obter a superfície de resposta completa para a produção enzimática, tanto aderida quanto secretada. Após, purificar a enzima bruta e conduzir experimentos de hidrólise e síntese, tanto com a lipase extracelular quanto com a lipase aderida à célula. Também pretende-se realizar a expressão e caracterização heteróloga das enzimas envolvidas, com objetivo de obter um produto de fácil purificação e comercialização.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M et al. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Braz. J. Chem. Eng.* 22 (01), 9-18.
2. Amaral, P. F. F. (2007). Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em biorreator multifásico. Tese de doutorado, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 243 p.
3. Ashford, B. (1928). Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 8, 507–538
apud Trofa, D.; Gacser, A. & Nosanchuk, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 606–625.
4. Benjamin, S & Pandey, A. (2000). Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43(5) 453-460.
5. Briand, D.; Dubreucq, E.; Galzy, P. (1995). Functioning and regioselectivity of the lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in aqueous medium. New interpretation of regioselectivity taking acyl migration into account. *Eur. J. Biochem.* 228, 169-175.
6. Briggs, B. (2011). Three quarter Plackett-Burman designs for estimating all main effects and two-factor interactions. Dissertação de mestrado. Department of Statistical Sciences & Operations Research. Virginia Commonwealth University. 61p.

7. Brunel, L.; Neugnot, V.; Landucci, L. et al. (2004). High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. J. Biotech. 111, 41-50.
8. Bueno, L. C. P. (2010) Isolamento e caracterização fisiológica de leveduras aquáticas da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí, RS, Brasil. Trabalho de conclusão de curso, Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
9. Bussamara, R.; Fuentefria, A. M.; Oliveira, E. S. et al. (2010). Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. Bioresource Technol 101, 268, 275.
10. Butler G.; Rasmussen, M. D.; Lin, M. F. et al. (2009) Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. nature 459 (4) 657-662
11. Carruba, G.; Pontieri, E.; De Bernardis, et al. (1991). DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol. 29, 916-922.
12. Corzo, G. & Revah, S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technol. 70, 173-180.
13. Dalmau, E.; Montesinos, J. L.; Lotti, M. et al.; (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme Microb. Technol. 26, 675-663.

14. De María, P. B.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra et al.; (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180-196.
15. Destain, J., Roblain, D. & Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 19 (2), 105–107.
16. Diezmann, S.; Cox C. J.; Schonian, G. et al.; (2004). Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. *J Clin Microbiol* 42, 5624–5635.
17. Essamri, M.; Deyris, V.; Comeau, L. (1998). Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. Biotechnol.* 60, 97-103.
18. Fickers, P.; Nicaud, J. M.; Destain, J.; et al. (2003). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 136-142.
19. Fickers, P.; Nicaud, J. M.; Gaillardin, C. et al. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 742-749.
20. Fickers, P.; Fudalej, F.; Nicaud, J. M. et al. (2005). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 115 379-386
21. Fuentefria, A. M. (2004). Identificação e avaliação do potencial biotecnológico de leveduras e fungos semelhantes a leveduras isolados de filoplano do *Hibiscus rosa-sinensis*. Dissertação de mestrado, Programa de

Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 131p.

22. Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. (2001). Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *J Biosc. Bioeng.* 92 (5) 405-416.
23. Fukuda, H.; Hama, S.; Tamalampudi, S. et al. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.* 26 (12) 668-673.
24. Fundyga, R. E.; Kuykendall, R. K.; Lee-Yang, W. et al. (2004) Evidence for aneuploidy and recombination in the human commensal yeast *Candida parapsilosis*. *Infect Gen Evol* 4 37–43.
25. Gadanho, M. & Sampaio, J. P. (2005). Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal Welds near the Azores Archipelago. *Microb. Ecol.* 50, 408–417.
26. Gupta, N.; Rathi, P. & Gupta, R. (2006). Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.* 311, 98-99.
27. Hama, S.; Yamaji, H.; Kaieda, M. et al. (2004) Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. *Biochem. Eng. J.* 21, 155-160.
28. Hasan, F.; Shah, A. A. & Hameed, A. (2006). Industrial application of microbial lipases. *Enz. Microb. Technol* 39, 235-251.
29. Hasanah, M. G. (1990) Production and characterisation of cell-bound lipases secreted by a newly isolated strain of *Geotrichum candidum*. Tese

de doutorado, Faculty of Food Science and Biotechnology, Universiti Pertanian Malaysia. 240p.

30. He, Q.; Xu, Y.; Teng, Y. et al. (2008) Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. *Chin. J. Catal.* 29 (1), 41-46.
31. Hill, T. & Lewicki, P. (2007). *STATISTICS: Methods and Applications*. StatSoft, Tulsa, OK.
32. Hlavsová, K.; Zarevúckaa, M.; Wimmerc, Z. et al. (2009). *Geotrichum candidum* 4013: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. *J. Mol. Catal. B* 61, 188-193
33. Jaeger, K. E.; Schneidinger, B.; Rosenau, et al. (1997). Bacterial lipases for biotechnological applications. *J Mol Catal B* 3, 3-12.
34. Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
35. Joachim, H. & Polayes, S. H. (1940) Subacute endocarditis and systemic mycosis (Monilia). Clinical notes, suggestions and new instruments, *J.A.M.A.* 115 (3) 205-208.
36. Koeller, K. M. & Wong, C.-H. (2001) Enzymes for chemical synthesis. *Nature* 409, 232-240.
37. Kurtzman, C.P. & Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371

38. Laffey, S. F & Butler, G. (2005) Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology* 151, 1073-1081.
39. Landell, M. F.; Hartfelder, C & Valente, P. (2006). Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Sci. Vet.* 34 (1), 49-55.
40. Landell, M. F. (2009) Avaliação da biodiversidade de leveduras associadas ao filoplano de bromélias em dois parques do Rio Grande do Sul utilizando métodos moleculares. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
41. Langeron M, Talice R (1932) Nouvelles méthodes d'étude et essai de classification des champignons levuriformes. *Ann Parasitol Hum Comp* 10:1–80
42. Lin, D.; Wu, L. C.; Rinaldi, M. G. et al. (1995). Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1815–1821.
43. Lis JT. (1980) Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 65 (1) 347-53.
44. Lopes, D. B.; Fraga, L. P.; Fleuri, L. F. et al. (2011). Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31 (3), 608-613.

45. López-Arboleda, W. A.; Ramírez-Castrillón, M.; Mambuscay-Mena, L. A. et al. (2010). Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12 (2), 176-186.
46. Matsumoto, T.; Takahashi, S.; Kaieda, M. et al. (2001). Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 515-520.
47. Nakase, T.; Komagata, K. & Fukazawa, Y. (1979) A comparative taxonomic study on two forms of *Candida parapsilosis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 25, 375–386.
48. Nakashima, T.; Fukuda, H.; Nojima, Y. et al., (1989). Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 68 (1), 19-24.
49. Narita, J. (2006) Display of active enzymes on the cell surface of *Escherichia coli* using PgsA anchor protein and their application to bioconversion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 564–572.
50. Neugnot, V.; Moulin, G.; Dubreucq, E. et al. (2002). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*. Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 269, 1734-1745.
51. Nie, K.; Xie F.; Wang, F. et al. (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 43 142–147.

52. Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Rodrigues, E. G. et al. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7, 789–98.
53. Nosek, J.; Holesova, Z.; Kosa, P. et al. (2009) Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr. Genet.* 55, 497-509
54. Osorio-Cadavid, E.; Ramírez, M.; López, A.W. et al. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev. Col. Biotecnol.* 11 (1), 125-131.
55. Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H. & Sant'anna, G.L. (1997). A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63 (65), pp.73-85.
56. Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H. & Sant'anna, G.L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.*, 22 (1), 71-75.
57. Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (2009). Spoilage of Stored, Processed and Preserved Foods *in: Fungi and Food Spoilage*, Springer Science Business Media, LLC. 401-421.
58. Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H. et al. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147-148, 237-250.
59. Sarda, L. & Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. *Biochim Biophys acta.* 30, 513-521.

60. Shah, S; Sharma, S. & Gupta, M. N. (2003) Enzymatic transesterification for biodiesel production. *Ind. J. Biochem Biophys* 40 392-399.
61. Sharma, R.; Chisti, Y. & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662.
62. Sharma, D.; Sharma B. & Shukla, A. K. (2011). Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A review. *Biotechnol.* 10 (1) 23-40.
63. Silva, A. B. & Silva, R. M. (2009). *Candida parapsilosis* oriunda de contaminação de mel como microrganismo candidato à degradação de glicerol proveniente da produção de biodiesel *In: VXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira pelo Progresso da Ciência - SBPC, Goiânia. Livro de Programa e Resumos da VXIII Reunião Anual da SBPC, p.2866, 2011.*
64. Silva (2011). Produção de biodiesel por catálise enzimática a partir de óleo de cardo. Dissertação de mestrado. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. 76p.
65. Solazyme & Chevron (2008). Focus on Catalysis: Enzymes for industrial applications. *Catal. Commun.* 9, 1050.
66. Souza, F. A. S. D.; Salgueiro, A. A. & Albuquerque, C. D. C. (2012). Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Braz. J. Chem. Eng.* 29 (01) 61-67.
67. Spanamberg, A.; Ramos, J. P.; Leoncini, O. et al. (2009). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Sci. Vet.* 37 (2), 133 - 141.

68. Stránský, K.; Zarevúcka, M.; Kejík, Z. et al. (2007) Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. *Biochem. Eng. J.* 34, 209-21
69. Sun, S. Y & Xu, Y. (2009). Membrane-bound 'synthetic lipase' specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: A comparative investigation. *Biores. Technol.* 100, 1336-1342.
70. Suzuki, T.; Ueda, T. & Watanabe, K. (1997) The 'polysemous' codon—a codon with multiple amino acid assignment caused by dual specificity of tRNA identity. *EMBO J.* 16, 1122–1134.
71. Tavanti, A.; Davidson, A.D.; Gow et al. (2005). *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov., to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J. Clin. Microbiol.* 43, 284–292.
72. Treichel, H.; Oliveira, D.; Mazutti, M. A.; et al. (2010) A review on microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.* 3, 182-196
73. Trofa, D.; Gacser, A. & Nosanchuk, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 606–625.
74. Tucker, J. L. (2006) Green Chemistry, a Pharmaceutical Perspective. *Org. Proc. Res.* 10, 315-319.
75. Turki, S.; Kraeim, B. I.; Weeckers, F. et al. (2009). Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technol.* 100, 2724-2731.

76. Vercher, M. P.; Martínez, J. M. G.; Cantón, E. et al. (2011) Differentiation of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* by specific PCR amplification of the RPS0 intron. *Int J Med Microb* 301, 531– 535.
77. Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15, 32-38
78. Wang, L.; Chi, Z.; Wang, X. et al. (2007). Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Ann. Microbiol.* 57 (4), 495-501.
79. Weems Jr., J.J., 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect Dis.* 14, 756–766.
80. Wong, C.-H. & Whitesides, G. M. (1994). *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry* (Pergamon, Oxford)
81. Wu, C.F.J. & Hamada., M.S. (2009) *Experiments: Planning, Analysis, and Optimization*. New Jersey, John Wiley & Sons apud Briggs, B. (2011) Three quarter Plackett-Burman designs for estimating all main effects and two-factor interactions. Richmond, U.S.A., 61p. (M.Sc. Thesis. Department of Statistical Sciences & Operations Research. Virginia Commonwealth University)
82. Zhao, H.; Zheng, L.; Wang, X. et al. (2011). Cloning, expression and characterization of a new lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 33, 2245-2452.

ANEXO 1 - LISTA DE REAGENTES E FABRICANTES.

Tabela 7: Lista de reagentes e fabricantes.

Reagente	Fabricante
2-propanol	Nuclear
Acetona	Nuclear
Agar	HiMedia
Goma Arabica	Merck
Cloreto de Cálcio	Nuclear
Cloranfenicol (Arifenicol)	Ariston, Argentina
Fosfato de Potássio Dibásico	Nuclear
EDTA	Nuclear
Etanol	Nuclear
Glicose	HiMedia
Ácido Clorídrico	Nuclear
Cloreto de Potássio	Nuclear
Sulfoato de Magnésio Heptahidratado	Nuclear
Cloreto de Magnésio	Nuclear
Cloreto de Sódio	Nuclear
Hidróxido de Sódio	Nuclear
n-Hexano	Nuclear
Óleo de oliva	Aceites Borges Pont
Peptona	HiMedia
p-nitrofenol	Sigma-Aldrich
p-nitrophenil Palmitato (pNPP)	Sigma-Aldrich
Kit Polimerase	Invitrogen
Iniciadores	Invitrogen
Sódio Dodecil Sulfato (SDS)	Nuclear
Citrato de Sódio	Nuclear
Fosfato de Sódio	Nuclear
Óleo de soja	Soya, Bunge Brasil
Tris base	Nuclear
Triton X-100	Sigma-Aldrich, CA USA
Triptona	Himedia
Triptona Plus	Organochemie
Tween 20	Himedia
Tween 80	Himedia

**ANEXO 2: MANUSCRITO REDIGIDO PARA SUBMISSÃO A REVISTA
CIENTÍFICA**

**OPTIMIZATION OF PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF AN
ALKALINE LIPASE SECRETED BY A NON-CLINICAL ISOLATE OF *Candida*
*parapsilosis***

Optimization of production and characterization of an alkaline lipase secreted by a non-clinical isolate of *Candida parapsilosis*

Ribas, R. K. C.; Carboni, D.S.; Flôres, S. H.; Vainstein; M. H.; Mendes, S.; Ramirez, M.; Valente, P.*

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil;

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil;

¹ Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e do Ambiente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil;

*Corresponding author: Patricia Valente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Rua Sarmiento Leite, 500. Sala 210. Centro.

Porto Alegre – RS. Brasil.

CEP 90150-170

Tel: +55 51-33084196

e-mail: patricia.valente@ufrgs.br

Abstract

Lipases (E.C. 3.1.1.3) are serine-hydrolases, and act on long chain fatty acid ester bonds. They exhibit specific and enantioselective activities, and as such there is plenty of interest for industry. This work aimed finding and optimizing the production of lipase by wild-type yeast strains from a variety of substrates, as well as to characterize this enzyme. An initial screening was made on tween 80 plates and oil-agar. Yeasts were then cultivated in oxygenated oil-supplemented minimum medium, and the supernatant had its enzymatic activity tested over p-nitrophenil Palmitate. One-hundred and eleven from different substrates were tested, and thirteen showed significantly higher lipolytic activity than the average ($p < 0.001$). Preliminary optimization showed optimal enzyme secretion in initial pH around 6.0, with olive oil and triptone as carbon and nitrogen sources, respectively. The crude enzyme (cell-free supernatant) shows stability against surfactants and n-hexan, but not against ethanol or methanol. Optimal enzyme activity conditions were observed at 28 °C at pH 8.0, through surface response methodology.

Introduction

Lipases (E.C. 3.1.1.3) catalyze hydrolysis and synthesis reactions over triacylglycerol esters. Its typical structure involves a catalytic triad (Ser-His-Asp), and its main residue, Serine, is commonly found in a (Ser-X-His-X-Asp) sequence (Jaeger et al., 1999; Reis et al., 2009). Lipases are distinguished from other esterases specially by its interfacial activity, given by a hydrophobic “lid” that covers the catalytic center and prevents it from acting on hydrosoluble substrates (Lopes et al., 2011; Reis et al., 2009; Sarda & Desnuelle, 1958; Verger, 1997). Nonetheless, lipases can hydrolyze many substrates of esterases, and the opposite also occur (Lopes et al., 2011). Besides acting over lipids, lipases possess interesting properties such as chemo-, regio- and stereoselectivity. Thus, a broad range of applications is possible, such as detergents and emulsifiers, biodiesel transesterification, paper pulp and leather cleaning, resolution of racemic solutions, among others (Sharma et al., 2011).

This enzyme is vastly distributed over nature, from Archaea to mammals, but microbial lipases are preferred since microorganisms secrete it to the outside of the cell, producing high yields of enzyme readily available to purification or direct utilization (Sharma et al., 2011). There are several reports of naturally occurring yeasts with high lipase production, specially belonging to the genera *Candida* and *Yarrowia* (Dalmau et al., 2000; De María et al., 2006; Fickers et al., 2003, 2004, 2005; Souza et al., 2012; Zhao et al., 2011), and substrates like food, plants and soil are common sources of those organisms.

Candida parapsilosis is a cosmopolitan yeast, being reported associated to diverse substrates such as mayonnese and salad toppings (Pitt & Hocking, 2009), honey (Silva & Silva, 2009), goat and cow milk and cheese (Landell et al., 2006; Spanamberg et al., 2009), colombian *chicha*, a fermented beverage (López-Arboleda, 2010), soil and water (Wang et al., 2007; Carruba et al. 1991; Gadanho and Sampaio 2005). Its pathogenicity is also described, and it is considered an opportunistic fungal pathogen (Weems 1992, Trofa et al., 2008). Due to their ability of transesterification under water activities higher than 0.9 (Neugnot et al., 2002), the lipases of *C. parapsilosis* have been described as good options for biodiesel and other biotechnological applications, and was successfully used for biodiesel transesterification, yielding up to 97% of efficiency (Silva, 2011).

Given the interest in naturally produced lipases, the objective of this work was to find a lipase-producing wild yeast, optimize its production conditions and the enzymatic activity conditions as well.

Material and Methods

Chemicals: The reagents were all of analytical grade.

Samples: Samples of soil and bromeliad leaves (Parque Farroupilha, Porto Alegre/Brazil) were aseptically collected in sterile bags, and one gram of soil or five grams of leaves were added to 100 mL of enrichment liquid medium composed of 2% Soy oil, 1% Peptone and 0.5% Yeast Extract, and kept for seven days on orbital shaker at 150 rpm. Fifty microliters from homogenized

supernatant were spread on YM plates - 1% Glucose, 0.5% Peptone, 0.3% Yeast Extract, 1% Agar, 0.04% Chloramphenicol, pH 4.0. Each different morphotype observed was isolated and purified in YM plates, in a total of strains. Additional 86 more strains were tested, previously isolated from cheese (Landell et al., 2006). All strains are maintained at the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Screening on Tween 80 and Oil-agar plates: All yeasts were at first grown on Tween 80 agar plates (Tween 80 0.5%, YNB 0.67%, agar 2%) and oil agar plates (soy oil 0.5%; peptone 0.5%; agar 2%). Strains capable of any minimum growth on any of them were selected for lipase testing.

Lipase induction: One-hundred microliters from a suspension of 10^6 cells/mL were inoculated in 100 mL of inductive medium (soy oil 2%, peptone 0.5%, magnesium sulphate 0.01%, potassium phosphate 0.1%), and grown in orbital shaker (Excella E24, New Brunswick, NJ, USA) at 200 rpm for 72h at 28 °C for lipase induction. Culture supernatants (cell-harboring and/or cell-free) were subjected to the p-nitrophenyl palmitate (pNPP) enzymatic assay. Crude (cell-free) extract was prepared by centrifugation at 5000 rpm, for 5 min, and the supernatant was used.

Enzymatic assay: pNPP assays were performed in triplicate, in Tris-Cl 50 mM Buffer pH 8.0, containing 0.11% Arabic Gum, 0.44% Triton x-100 and 10% pNPP at 3mg/mL of 2-propanol, according to Gupta et al. (2002). This substrate solution was added to supernatant (9:1) and kept for 1h at 37 °C. The released product pNP exhibits yellow color, which absorbs light at 405-410nm. Absorbance was then measured with spectrophotometer at wavelength of 410 nm (Ultraspec 3000 - Pharmacia Biotech, AB, Sweden) or Elisa microplate reader at wavelength of 405 nm (ELx800 – BioTek Instruments Inc, VT USA).

Optimization of the conditions for lipase induction by univariate analysis: Initially, different pH (3, 6 and 9), organic nitrogen sources (peptone and triptone) and carbon sources (soy and olive oils, tween 20 and tween 80) were tested in order to verify optimal conditions for lipase induction. Based on these preliminary results, further pH tests (5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0) were

performed using tryptone and olive oil as nitrogen and carbon sources, respectively. The concentrations are the same as above; pH was adjusted by HCl or NaOH, as needed, but was not controlled during yeast growth. Lipase reactions were performed with cell-harboring and cell-free supernatants, in order to detect both extracellular and cell-bound lipases.

Optimization of the conditions for lipase induction by Plackett-Burman Experimental Design (PBED): A fifteen-factor sheet was chosen to verify the influence of 12 variables, namely: pH (4 and 9), temperature (25/30/35/40 °C), and presence/absence of soy oil 0.5%, olive oil 0.5%, tween 20 0.5%, tween 80 0.5%, peptone 0.5%, tryptone 0.5%, yeast extract 0.5%, YNB 0.67%, magnesium sulphate 0.01% and potassium phosphate 0.1%. Analysis of PBED was made by the Statistica 7 software. All measurements were made with cell-free supernatants.

Enzyme activity optimization: A response surface curve was generated based on a Central Composite Design constructed using the Statistica 7 software (Statsoft Inc. 2005). The factors pH and Temperature were taken into account in this design. The reaction was performed as above, except for the buffers which were either Tris 50mM for pH 7.5 or above, or Citrate-Phosphate 50mM for pH under 7.5.

Enzyme stability characterization: The cell-free supernatant was co-incubated (concentration of 1:1 v:v) for one hour at 37 °C with different Salts [50mM] (MgCl₂, KCl, CaCl, NaCl and EDTA), Solvents (n-Hexan, Acetone and Isopropanol 20%, 50% and 80%; ethanol 20%, 50% and 99,5%) and detergents 1% (SDS, Triton X-100 and Tween 20). A control was made with distilled water (1:1 v:v). The residual activity was measured by the pNPP aforementioned test.

Yeast strain identification: Strain QU110 was grown aerobically in GYP broth (2% glucose, 1% peptone, 0.5% yeast extract) at 28 °C. Total genomic DNA was extracted and purified from 5 mL cultures as described by Osorio-Cadavid *et al.* (2009). Sequencing of the D1/D2 domain of the large subunit (26S) ribosomal DNA was performed according to Kurtzman and Robnett (1998), using the primers NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') and NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). The amplification conditions were: initial denaturation at 94°C

for 5 min, 30 cycles of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 55°C for 30 s, extension at 72°C for 1 min, and final extension at 72°C for 10 min. The PCR product was purified by the polyethylene glycol precipitation method (Lis, 1980), and sequenced at the Biotechnology Center of Federal University of Rio Grande do Sul (Cbiot/UFRGS), Brazil. The sequence was assembled and compared with sequences reported in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm.

Statistical analysis: The results of the preliminary screening were subjected to “t” test of Student, with $P < 0.001$. All graphic data shown harbor deviation bars corresponding to $P = 0.05$.

Results

Lipase production

One-hundred and eleven strains were tested in duplicate (data not shown), and their lipase activity was compared one with one another, using the “t” test of student. Twelve strains showed significantly higher lipase activity than the average ($P < 0.05$). Strain QU110 was selected for optimization of lipase production due to its high lipase activity when compared to the others and consistency between the replicates. This yeast was isolated from an artisanal Caccio Cavalo cheese sample (14), and was identified as *Candida parapsilosis* by sequencing of the D1/D2 region of the 26S rDNA.

The effect of different carbon sources over lipase production can be seen in Figure 1. *C. parapsilosis* QU110 showed lipase production of 47.97 u/L in the presence of olive oil, more than ten times the activity in the presence of soy oil, tween 20 or tween 80. However, the cell-free supernatant showed lipase activity of only 9.23 u/L (Fig. 1).

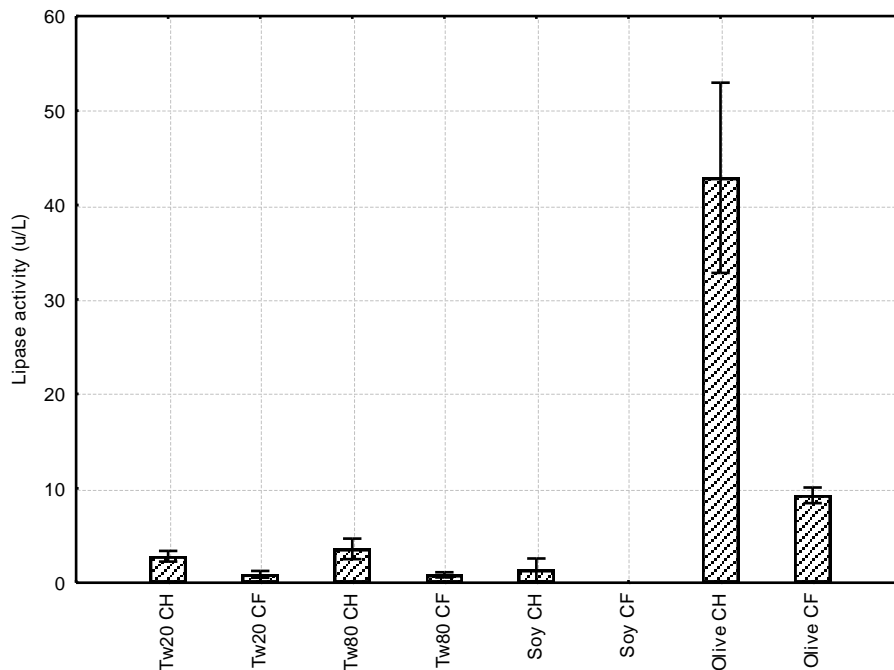


Figure 1: Effect of different carbon sources over lipase production. Tw20: Tween 20; Tw80: Tween 80; Soy: Soy oil; Olive: Olive oil. H: cell-harboring supernatant. CF: cell-free supernatant.

Tryptone was the most remarkable nitrogen source regarding lipase production in pH 6.0, inducing an activity of 47.02 u/L in cell-harboring supernatant and 36.98 u/L in cell-free supernatant (Fig. 2). Two different brands of tryptone were used (HiMedia and Organochemie), generating different inductions. Whilst the first induced extracellular lipase production, the latter only showed lipase activity in the cell-harboring supernatant (data not shown). In pH 9.0, there was a slight reduction in lipase activity in the cell-harboring supernatant (43.01 u/L), and there was no lipase secretion (Fig. 2). Further tests showed lipase induction by tryptone also in pH 5-6.5 (data not shown). The absence of lipase secretion in pH 9.0 was also observed with peptone as nitrogen source, while there was an increase in lipase activity in the cell-harboring supernatant (31.05 u/L) in comparison to pH 6.0. The results mentioned above emphasize the interrelation among the variables that can influence lipase production. In order to test this interrelation, a Plackett Burman Experimental Design was performed based on a fifteen-factor sheet. The resulting analysis indicates the positive contribution of tween 20 and YNB for induction of lipase production, although not statistically significant (data not shown). As there was no variable with a significant contribution to lipase production, a response surface curve was not generated.

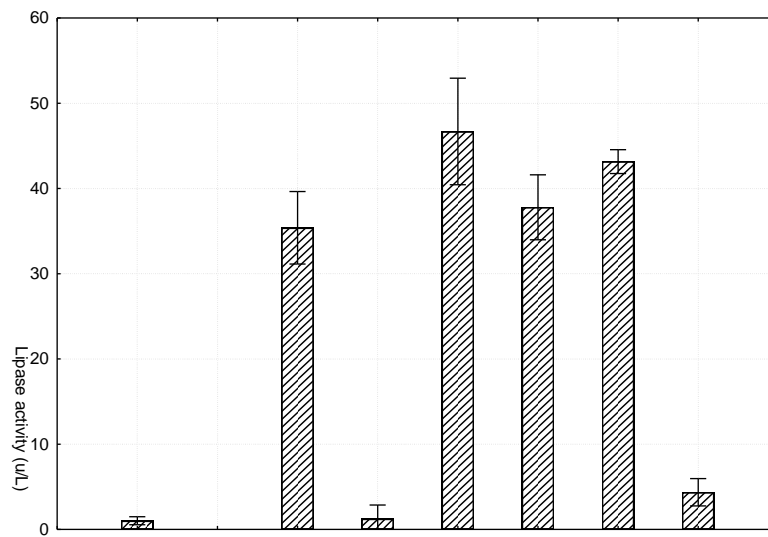


Figure 2: Effect of different pH and nitrogen sources over lipase production. P: Peptone; T: Tryptone; 6 and 9: pH used; CH: cell-harboring supernatant CF: cell-free supernatant.

The best activity conditions for the lipase produced by *C. parapsilosis* QU110 were pH 8.0 and temperature of 36 °C, although the model predicts a larger ranges (Fig. 3).

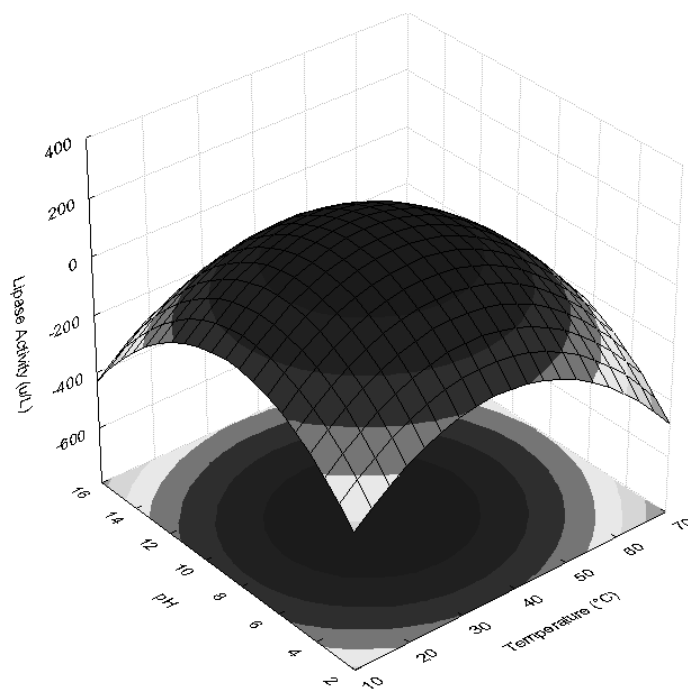


Figure 3: Response surface model of lipase production (u/L) considering pH and Temperature (°C). Light areas indicate lower lipase activity, and dark ones, higher activities.

The crude enzyme showed an inhibition greater than 50% for concentrated solvents, and good stability to anionic surfactants, retaining up to 80% of activity in the presence of Tween 80 (Fig. 4a). Mono and divalent ions seemed to destabilize the enzyme (Fig. 4b), which showed residual activities under 40% when treated with CaCl_2 . Most solvents showed strong inhibition and destabilization of the lipase, especially when concentrated. In contrast, n-Hexan 40% (v:v) increased lipase activity in about 5% (Fig. 4c).

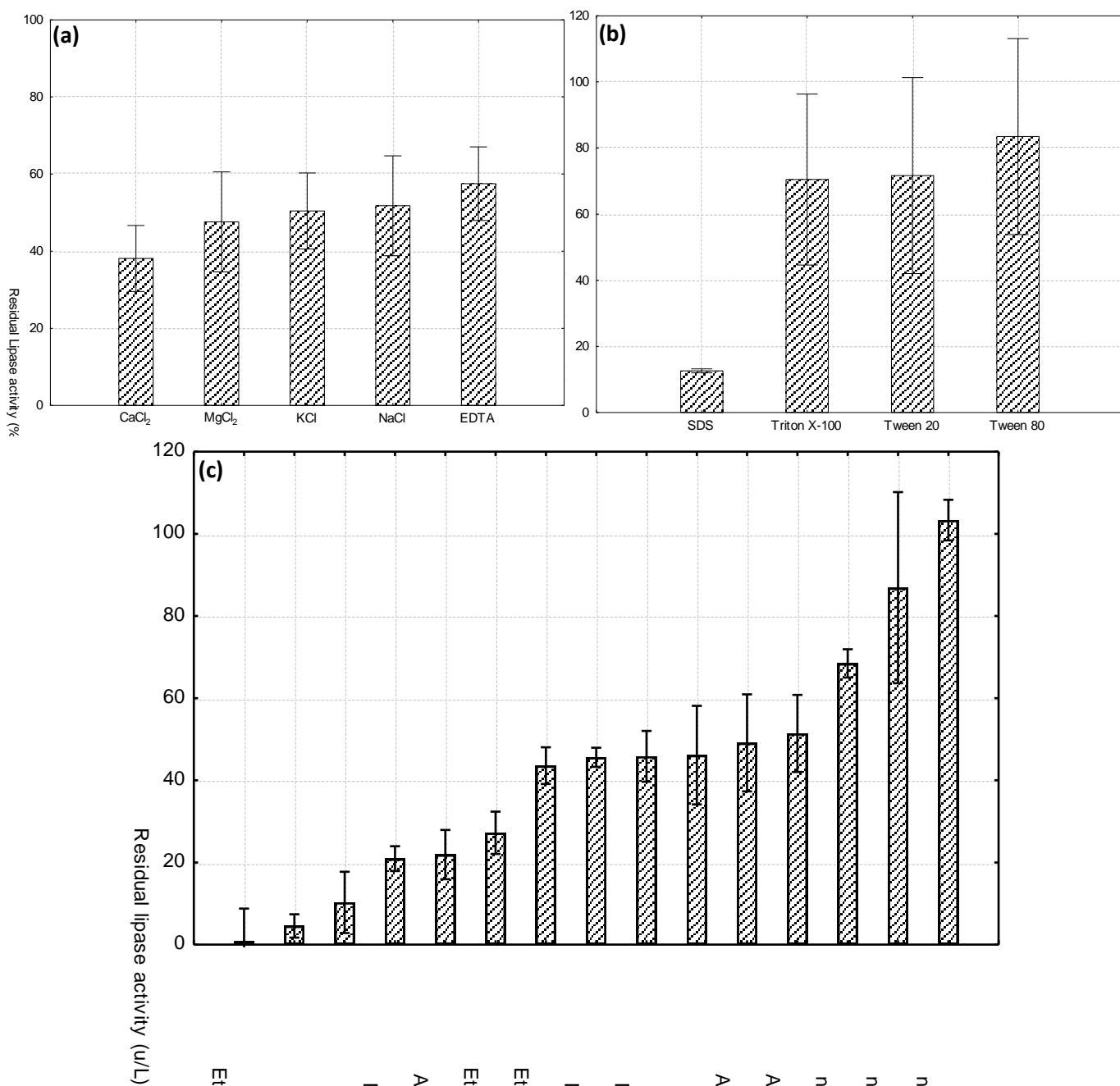


Figure 4: Residual extracellular lipase activity (%) after exposition against mono, divalent and chelating salts (a), surfactants (b) and several concentrations of different solvents (c) for 1 hour at 37 °C.

Discussion

The preliminary screening step performed with 110 strains from different sources evidenced that, although lipase production is widespread, most wild yeast strains have low activities. In accordance to this, Fickers et al (2003) reported that a wild strain of *Yarrowia lipolytica* had activities up to 1,774 times lower than the derived mutant strain. As all the wild strains tested in the present study had low lipase activities compared to the ones reported in the literature, our screening approach focused on the comparison among the 110 Brazilian strains tested in the present study. The yeasts which showed higher lipase activity than the average of all the tested strains were selected as good lipase producers. Lipase activity was evaluated in duplicate for each strain, and *C. parapsilosis* QU110 was selected for lipase production optimization and lipase activity characterization.

Our results reinforce the knowledge that medium composition influences lipase activity. The mutant strain *Yarrowia lipolytica* LgX64.81, which had its catabolic pathway de-repressed, showed no lipase production in presence of only mineral nitrogen sources (Fickers, 2003; 2004; 2005), and induction of lipase production by tryptone and oleic acid, similar to our results with *C. parapsilosis* QU110. Even subtle variations in medium composition, such as the different brands of tryptone used in our work, can affect lipase production and/or secretion, as was also reported by Turki et al. (2009), who showed that different lysates of protein sources induce differentially the lipase production on the same strain.

The effect of the nitrogen source on lipase production was influenced by the pH of the medium. Although tryptone induced lipase secretion in pH 6.0 (cell-free supernatant), the same did not occur in pH 9.0, with the highest activity at this pH being found at the cell-harboring supernatant. Lipase production with peptone was almost negligible in pH 6.0, while the cell-harboring supernatant from pH 9.0 showed lipase activity. Thus, pH 9.0 induced lipase production with both nitrogen sources, although it seemed to inhibit lipase secretion. We tentatively explained the behavior of the *C. parapsilosis* QU110 lipase activity in different pH by an influence of pH on

the secretion of the enzyme, with the inhibition of lipase secretion by alkaline conditions. Thus, it would remain attached to the cell-wall, explaining the lipase activity in the cell-harboring supernatant. To our knowledge, no reports have been made in this regard so far.

An alternative explanation would be that two different lipases (cell-bound and extracellular) are produced in the different pH. In accordance to this two-enzyme hypothesis, Neugnot et al. (2002) and Briand et al (1995) reported two lipase genes for *C. parapsilosis* CBS 604, a clinical isolate. These two lipases were shown to possess similar properties, both when expressed in the wild strain and in *Saccharomyces cerevisiae* (Neugnot, 2002). Although little is known about lipase secretion mechanisms in fungi, it is known that the fungal cell wall is a dynamic and complex structure, and besides saccharides and glycoproteins, it can contain several proteins and enzymes (Nimrichter et al., 2005). In this context, it is plausible that lipases are found associated to the cell wall, both attached to it or transiently passing through it before secretion. Stransky et al. (2007) showed different conditions to induce extracellular and cell-bound lipases in *Geotrichum candidum* 4013, and Pereira-Meirelles et al. (2000) stated that, in *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682, lipase secretion is dependent on the growth stage, with extracellular activity found at the late stationary phase, while late logarithmic phase is associated to cell-bound lipase activity.

Although no factor was statistically significant in the Plackett-Burman experimental design, there was an indication that tween 20 and YNB could positively contribute to lipase production, while previous unvaried experiments showed no lipase induction with these components (data not shown). Plackett-Burman designs evaluate the interaction among the variables, thus some hypothesis can be raised to explain the different results between the unvaried experiments and the PBDE. YNB could have acted by supplementation of organic nitrogen sources, showing a positive effect when used together with them, but having no effect when used as the sole nitrogen source. Similarly, tween 20 was not a good carbon source when used alone, but it could have induced mild emulsion of oils, favoring lipase induction, as well as increased secretion through augmented cellular permeability.

Briggs (2011) shows that typical Plackett-Burman designs tend to confound individual and synergic contributions, especially when many effects are analyzed at once. Wu & Hamada (2009) also state that a strong drawback of such non-regular designs, which reduce the number experiments of an optimization to minimum, is the introduction of complex aliasing to the model, generating fractions of effects aliased with each other that cannot be ignored and thus causing problems to analysis. This could cause the lack of significance in our results, and should be further exploited.

Although previous works report mildly acidic conditions for activity tests of *C. parapsilosis* lipase (Briand et al., 1996; Brunel et al., 2004; Neugnot et al., 2002), few try to optimize those conditions. Wang et al. (2007) show optimal activity pH for cell-bound lipase from *C. parapsilosis* to be 7.5 but no extracellular lipases are shown. Activity optimization and enzyme characterization are common in articles dealing with lipases from other yeast species, as *Y. lipolytica* lipase, whose optimal pH for hydrolytic activity was found to range from 6 to 7.5. Nonetheless, even in pH 4.0 it retained specific activity, and its optimal temperature was reported to be as high as 55 °C (Corzo & Revah, 1999; Destain, 1997, Pereira-Meirelles, 1997). Regarding *Candida rugosa*, three forms (called *Lip A*, *Lip B* and *Lip C*) have been reported to show optimum temperature of 35-40 °C, while the optimal pH were shown to be 7.0 for *Lip A*, 7.0-7.5 for *Lip C*, and 7.5-8.0 for *Lip B*. (Benjamin & Pandey, 2000). All three forms show optima pH and temperatures ranges similar to the lipase of *C. parapsilosis* Qu110.

Stability characteristics seem to agree with typical lipases, showing stabilization against n-hexan and instability for solvents and ionic surfactants (Shah 2003, Nie, 2006). Acetone 10% and 25% show destabilization of about 50%, less than other solvents tested, coherent with reports of its use for cell-preparation for interesterification (Nakashima et al., 1989) and whole-cell biocatalysis (Essamri et al., 1998).

Cell-bound lipases are subject of many works, as they act as whole-cell biocatalysts, presenting several advantages especially for biodiesel applications (Fukuda 2001, Fukuda 2009,

Qin 2008, Hama 2004). It is also known that *C. parapsilosis* lipase possesses transesterase properties in aqueous medium (Destain et al., 1997; Neugnot et al., 2002), properties that altogether make this strain very promising for biotechnological applications.

Gácsér (2007), in human reconstituted tissues, reported the inhibition of the infection by four clinical strains of *C. parapsilosis* by inhibiting serine esterases, thus preventing lipases to act over tissues. It is not stated if the inhibition occurred over extracellular, cell-bound, or both lipases.

Conclusion

It is known that lipase production is strongly influenced by medium conditions, thus modulating its secretion (Alonso et al., 2005; Dalmau et al., 2000; Destain et al., 1997; Fickers, 2003; 2005; Pereira-Meirelles, 1997; Turki et al., 2009; Wang et al., 2007). Our work shows that *C. parapsilosis* QU110 is induced in different conditions to produce lipases that can possibly be either secreted or bound to the cell, and Surface Methodology Response model suggests a broad range of optimum lipase activity conditions of pH and T °C.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support by FAPERGS, CNPq and CAPES.

References

1. Alonso, F.O.M.; Oliveira, E.B.L.; Dellamora-Ortiz, G.M.; Pereira-Meirelles, F.V. (2005). Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Braz. J. Chem. Eng.* 22 (01), 9-18.
2. Benjamin, S & Pandey, A. (2000). Isolation and Characterization of Three Distinct Forms of Lipases from *Candida rugosa* Produced in Solid State Fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43(5) 453-460.
3. Briand, D.; Dubreucq, E.; Galzy, P. (1995). Functioning and regioselectivity of the lipase of *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice in aqueous medium. *New*

- interpretation of regioselectivity taking acyl migration into account. *Eur. J. Biochem.* 228, 169-175.
4. Briggs, B. (2011). Three quarter Plackett-Burman designs for estimating all main effects and two-factor interactions. Richmond, U.S.A., 61p. (M.Sc. Thesis. Department of Statistical Sciences & Operations Research. Virginia Commonwealth University)
 5. Brunel, L.; Neugnot, V.; Landucci, L.; Boze, H.; Moulin, G.; Bigey, F.; Dubreucq, E. (2004). High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. *J. Biotech.* 111, 41-50.
 6. Carruba, G.; Pontieri, E.; De Bernardis, F.; Martino, P; Cassone, A (1991). DNA fingerprinting and electrophoretic karyotype of environmental and clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.* 29, 916-922.
 7. Corzo, G. & Revah, S. (1999). Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technol.* 70, 173-180.
 8. Dalmau, E.; Montesinos, J. L.; Lotti, M.; Casas, C. (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 675-663.
 9. De María, P. B.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Alcántara, A. R. (2006). Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180-196.
 10. Destain, J., Roblain, D. & Thonart, P. (1997). Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 19 (2), 105–107.
 11. Essamri, M.; Deyris, V.; Comeau, L. (1998). Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. *J. Biotechnol.* 60, 97-103.
 12. Fickers, P.; Nicaud, J. M.; Destain, J.; Thonart, P. (2003). Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 136-142.

13. Fickers, P.; Nicaud, J. M.; Gaillardin, C.; Destain, J.; Thonart, P. (2004). Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 742-749.
14. Fickers, P.; Fudalej, F.; Nicaud, J. M.; Destain, J.; Thonart, P. (2005). Selection of new over-producing derivatives for the improvement of extracellular lipase production by the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biotechnol.* 115 379-386
15. Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H. (2001). Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. *J Biosc. Bioeng.* 92 (5) 405-416.
16. Fukuda, H.; Hama, S.; Tamalampudi, S.; Noda, H. (2008). Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. *Trends Biotechnol.*, 26 (12) 668-673.
17. Gácsér, A.; Schäfer, W.; Nosanchuk, J. S.; Salomon, S.; Nosanchuk, J. D. (2007). Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet. Biol.* 44, 1336-1341.
18. Gadanho, M.; Sampaio, J. P. (2005). Occurrence and diversity of yeasts in the mid-Atlantic ridge hydrothermal Welds near the Azores Archipelago. *Microb. Ecol.* 50, 408–417.
19. Gupta, N.; Rathi, P.; Gupta, R. (2002). Simplified *para*-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.* 311, 98-99.
20. Jaeger, K. E.; Dijkstra, B. W.; Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315-351.
21. Kurtzman, C.P. y Robnett, C.J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331-371
22. Landell, M. F.; Hartfelder, C.; Valente, P. (2006). Identification and enzymatic profile of yeasts isolated from artisanal cheese in Southern Brazil. *Acta Sci. Vet.* 34 (1), 49-55.
23. Lis JT. (1980) Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. *Methods Enzymol.* 65 (1) 347-53.

24. Lopes, D. B.; Fraga, L. P.; Fleuri, L. F.; Macedo, G. A. (2011). Lipase and esterase – to what extent can this classification be applied accurately? *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 31 (3), 608-613.
25. López-Arboleda, W. A.; Ramírez-Castrillón, M.; Mambuscay-Mena, L. A.; Osorio-Cadavid, E. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Rev. Colob. Biotecnol.* 12 (2), 176-186.
26. Nakashima, T.; Fukuda, H.; Nojima, Y.; Nagai, S. (1989). Intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* using biomass support particles in a circulating bed fermentor. *J. Biosci. Bioeng.* 68 (1), 19-24.
27. Neugnot, V.; Moulin, G.; Dubreucq, E.; Bigey, F. (2002). The lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis*. Molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur. J. Biochem.* 269, 1734-1745.
28. Nie, K.; Xie F.; Wang, F.; Tan, T. (2006) Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 43 142–147.
29. Nimrichter, L., Rodrigues, M. L., Rodrigues, E. G., Travassos, L. R. (2005). The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. *Microbes Infect.* 7, 789–98.
30. Osorio-Cadavid, E.; Ramírez, M.; López, A.W.; Mambuscay, L.A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Rev. Col. Biotecnol.* 11 (1), 125-131.
31. Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H.; Sant'anna, G.L. (1997). A stable lipase from *Candida lipolytica* – cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63 (65), pp.73-85.
32. Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leão, M.H.; Sant'anna, G.L. (2000). Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.*, 22 (1), 71-75.
33. Pitt, J.I., Hocking, A.D. (2009). Spoilage of Stored, Processed and Preserved Foods *in: Fungi and Food Spoilage*, Springer Science Business Media, LLC. 401-421.

34. Reis, P.; Holmberg, K.; Watzke, H.; Leser, M. E.; Miller, R. (2009). Lipases at interfaces: A review. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147-148, 237-250.
35. Sarda, L.; Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en emulsion. *Biochim Biophys acta.* 30, 513-521.
36. Shah, S; Sharma, S.; Gupta, M. N. Enzymatic transesterification for biodiesel production (2003) *Ind. J. Biochem Biophys* 40 392-399.
37. Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19, 627-662.
38. Sharma, D.; Sharma B.; Shukla, A. K. (2011). Biotechnological Approach of Microbial Lipase: A review. *Biotechnol.* 10 (1) 23-40.
39. Silva, A. B., Silva, R. M. (2009). *Candida parapsilosis* oriunda de contaminação de mel como microrganismo candidato à degradação de glicerol proveniente da produção de biodiesel. 63ª Reunião Anual da SBPC.
40. Silva (2011). Produção de biodiesel por catálise enzimática a partir de óleo de cardo (dissertation). Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. 76p.
41. Souza, F. A. S. D.; Salgueiro, A. A.; Albuquerque, C. D. C. (2012). Production of bioemulsifiers by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source. *Braz. J. Chem. Eng.* 29 (01) 61-67.
42. Spanamberg, A.; Ramos, J. P.; Leoncini, O.; Alves, S. H.; Valente, P. (2009). High frequency of potentially pathogenic yeast species in goat's raw milk and creamed cheese in Southern Brazil. *Acta Sci. Vet.* 37 (2), 133 - 141.
43. Stránský, K.; Zarevúcka, M.; Kejík, Z.; Wimmer, Z.; Macková, M.; Demnerová, K. (2007) Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. *Biochem. Eng. J.* 34, 209-216

44. StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (data analysis software system), version 7.1.
www.statsoft.com.
45. Turki, S.; Kraeim, B. I.; Weeckers, F.; Thonart, P.; Kallel, H. (2009). Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technol.* 100, 2724-2731.
46. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21, 606–625.
47. Verger, R. (1997). ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15, 32-38
48. Wang, L.; Chi, Z.; Wang, X.; Liu, Z.; Li, J. (2007). Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes. *Ann. Microbiol.* 57 (4), 495-501.
49. Weems Jr., J.J., 1992. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect Dis.* 14, 756–766.
50. Wu, C.F.J. & Hamada., M.S. (2009) *Experiments: Planning, Analysis, and Optimization*. New Jersey, John Wiley & Sons.
51. Zhao, H.; Zheng, L.; Wang, X.; Liu, Y.; Xu, L.; Yan, Y. (2011). Cloning, expression and characterization of a new lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 33, 2245-2452.

ANEXO 3: CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

Ribas, R. K. C.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Rodolfo Krüger da Câmara Ribas

Nascimento: 04/01/1982 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Telefone: +55 (51) 9174-2180

E-mail: rodolfo.ribas@gmail.com

2. FORMAÇÃO:

2010 – 2012 Mestrado em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM/UFRGS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Título: Otimização da produção e caracterização de uma lipase alcalina secretada por um isolado não-clínico de *Candida parapsilosis*.

Orientadora: Prof^a Patricia Valente

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

2001 – 2006 Graduação em Ciências Biológicas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil

Título: Identificação de leveduras balistosporogênicas isoladas de diversas plantas no Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Patricia Valente

3. ESTÁGIOS:

2009 Agrônoma Laboratório de Diagnóstico Fitossanitário e Consultoria

Estágio em fitomicrobiologia molecular, implementação e padronização de protocolos de diagnóstico molecular.

2006 LACEN/FEPPS-RS

Estágio curricular nos setores de Micologia, Virologia e Biologia molecular.
Laboratório Central - Fundação de Produção e Pesquisa em Saúde, Rio Grande do Sul, Brasil.

2005-2006 Laboratório de Micologia – ICBS/UFRGS

Estágio de iniciação científica em microbiologia tradicional e prospecção biotecnológica. Orientadora: Prof^a Patricia Valente.
Laboratório de Micologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2001-2003 Laboratório de Drosophila – Depto. De Genética/UFRGS

Estágio de iniciação científica em genética e biologia molecular de Drosophila. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul - FAPERGS Orientadora: Prof^a Vera Valente.

4. Artigos Completos Publicados:

1. Senter, L ; Ribas, R K C ; Valente, P. (2011) Optimization of the cultivation conditions for the production of an antimicrobial compound produced by *Trichosporon japonicum* QU139.. Rev Bras. de Bioc. 9, 72-76.

5. Resumos trabalhos apresentados em congressos:

5.1. Como primeiro autor

1. Ribas, R.K.C., Vainstein, MH, Valente, P. (2011) Produção e otimização pro metodologia de superfície de resposta e design fatorial de Plackett-Burman de uma lipase alcalina pela levedura QU110 isolada de queijo colonial. In: Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu, PR.

2. Ribas, R. K. C.; Senter, L. ; Poli, J. S. ; Mendes, S. D. C. ; Vainstein, M. H.; Valente, P. (2010) Seleção de leveduras isoladas de queijo produtoras de lipases. In: II Encontro Gaúcho de Micologia, 2010, Caxias do Sul. Anais do II Encontro Gaúcho de Micologia.
3. Ribas, R. K. C. & Schultz, C. L. (2008) Contribuição ao conhecimento da fauna da biozona de traversodontídeos (Triássico médio-superior) do Rio Grande do Sul, Brasil. Oral Presentation. In: Paleo 2008 (Encontro Regional da Sociedade de Paleontologia). Paleontologia em Destaque - Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Paleontologia. 62 25-26.
4. Ribas, R. K. C.; Mautone, J. N.; Landell, M.F.; Valente, P. (2005) Identificação e análise do potencial biotecnológico de leveduras balistosporogênicas associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul. Anais do XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005.
5. Ribas, R. K. C. ; Blauth, M.L.; Gaiessky, V. L. S. V. ou Valente, V.L.S. (2003) Investigação sobre elementos transponíveis de *Drosophila willistoni* como causadores da disgenesia do híbrido. In: XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre. CDRom. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. v. 1. p. 1-1.

5.2 Como segundo autor:

6. Tisca, J.F., Ribas, R.K.C., Valente, P. Avaliação da capacidade decolorante de leveduras isoladas da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí, RS. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu.PR. Anais do 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011.
7. Senter, L.; Ribas, R. K. C. ; Stopiglia, C. D. O. ; Scrofernerker, M. L.; Valente, P. Otimização da produção de compostos antimicrobianos de *Trichosporon japonicum* QU139 para desenvolvimento de um novo agente antifúngico. 2010. In: 6º Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasília, DF. Anais do 6º Congresso Brasileiro de Micologia.

8. Valente, P.; Ribas, R. K. C.; Senter, L.; Poli, J. S. Mendes, S. D. C.; Vainstein, M. H. Seleção de leveduras produtoras de lipases isoladas de queijo.. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010, Brasília. Anais do VI Congresso Brasileiro de Micologia, 2010.
9. Mautone, J. N.; Ribas, R. K. C.; Landell, M. F ; Valente, P. Perfil fisiológico e enzimático de leveduras associadas à vegetação de Mata Atlântica no Rio Grande do Sul.. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos. Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005. p. 277.
10. Blauth, M. L.; Ribas, R. K. C.; Gaiesky, V. L. S. V. ou Valente, V.L.S. Expressão de elementos transponíveis em linhagens de *Drosophila willistoni*. In: 49 Congresso Nacional de Genética, 2003, Águas de Lindóia. CD Rom. Águas de Lindóia : São Francisco Gráfica e Editora, 2003. v. 1. p. 1-1.

5.3 Como terceiro autor (ou após):

11. Poli, J. S. ; Senter, L. ; Mendes, S. D. C. ; Ribas, rodolfo kruger da câmara ; Vainstein, marilene henning ; Valente, patrícia . padronização do tempo de cultivo para produção de lipídeos pela linhagem de levedura qu21.. in: vi congresso brasileiro de micologia, 2010, brasília. anais do vi congresso brasileiro de micologia, 2010.
12. Senter, I. ; Bueno, L. C. P. ; Pinheiro, M. S. ; Ribas, rodolfo kruger da câmara ; Poli, j. s. ; Valente, patrícia . halotolerância de leveduras aquáticas no rio grande do sul, brasil.. in: vi congresso brasileiro de micologia, 2010, brasília. anais do vi congresso brasileiro de micologia, 2010.
13. Senter, I. ; Mendes, S. D. C. ; Poli, J. S. ; Valente, patrícia . Influência do NaCl no crescimento da levedura aquática TR08 isolada do estuário do rio tramandaí, RS. in: II Encontro gaúcho de micologia, 2010, Caxias do Sul. anais do ii encontro gaúcho de micologia, 2010.

14. Poli, J. S. ; Senter, L. ; Mendes, S. D. C. ; Ribas, R. K. C.; Kanan, J. H. C.; Vainstein, M. H.; Valente, P. Seleção de leveduras isoladas de queijo produtoras de óleo microbiano. in: II Encontro gaúcho de micologia, 2010, Caxias do Sul. Anais do II encontro gaúcho de micologia, 2010.
15. Senter, L. ; Pinheiro, M. S. ; Poli, J. S.; Ribas, R. K. C.; Lopes, B. S.; Mendes, S. D. C.; Valente, P. Halotolerância de leveduras aquáticas isoladas de animais marinhos incrustantes. in: II encontro gaúcho de micologia, 2010, Caxias do Sul. Anais do II encontro gaúcho de micologia, 2010.
16. Senter, L. ; Bueno, L.C.P. ; Pinheiro, M.S. ; Ribas, R. ; Poli, J. S. ; Valente, P. Seleção de leveduras halotolerantes para aplicação biotecnológica. in: XX Congresso latinoamericano de microbiología e IX Encuentro nacional de microbiólogos, 2010, Montevideo. XX Congresso latinoamericano de microbiología y IX encuentro nacional de microbiólogos, 2010.
17. Poli, J. S. ; Rosa, P.D. ; Senter, L. ; Mendes, S. D. C. ; Ribas, R.; Kanan, J. H. C. C. ; Vainstein, M.H. . Avaliação de leveduras produtoras de óleo microbiano. In: XIII Congresso catarinense de farmacêuticos e bioquímicos, 2010, Florianópolis. XIII Congresso catarinense de farmacêuticos e bioquímicos, 2010.
18. Poli, J. S.; Senter, L. ; Rosa, P.D. ; Mendes, S.D.C; Ribas, R.; Vainstein, M.H.; Valente, P. Triagem de leveduras acumuladoras de lipídeos por meio da utilização do corante vermelho de nilo. in: VI congresso brasileiro de micologia, 2010, Brasília. VI Congresso brasileiro de micologia, 2010.
19. Landell, M. F. ; Mautone, J. N.; Franco, M. T.; Ribas, R.K.C.; Sebolt, M.; Valente, P. Diversidade de leveduras associadas a bromélias do parque de Itapuã, Viamão/RS. in: XXIII congresso brasileiro de microbiologia, 2005, Santos. Anais do XXIII Congresso brasileiro de microbiologia, 2005. p. 276.

20. Landell, M. F.; Mautone J.N.; RibasR.K.C.; Franco, M. T.; Sebolt, M.; Valente, P. Potencial biotecnológico de leveduras isoladas da superfície foliar do bromélias do parque de Itapuã, Viamão/RS.. XXIII congresso brasileiro de microbiologia, 2005, Santos. Anais do XXIII Congresso brasileiro de microbiologia, 2005. p. 300.