



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Adelaide Correia Braga

**Biotransformação do óleo de rícino em
aromas por *Yarrowia lipolytica***

Novembro de 2009



Universidade do Minho

Escola de Engenharia

Adelaide Correia Braga

Biotransformação do óleo de rícino em aromas por
Yarrowia lipolytica

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efectuado sob a orientação da

Doutora Isabel Maria Pires Belo

Novembro de 2009

Autora: Adelaide Correia Braga

Endereço electrónico: adelaidebraga1@gmail.com

Título tese: Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica*

Orientadores:

Doutora Isabel Maria Pires Belo

Ano de conclusão: 2009

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

É AUTORIZADA APENAS A CONSULTA DESTA TESE PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Universidade do Minho, Novembro de 2009

“Whatever you do will be insignificant, but it is very important that you do it.”

Mahatma Gandhi

Aos meus pais por tudo o que fizeram por mim.

Agradecimentos

Ao terminar esta tese não posso deixar de expressar o meu mais sincero agradecimento a todas as pessoas que me apoiaram e ajudaram para que pudesse concluí-la com sucesso.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Isabel Belo, pelo apoio concedido, disponibilidade e optimismo que sempre demonstrou nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial à Nelma Gomes, pelos ensinamentos, pela experiência transmitida e pelos conselhos sempre essenciais. Agradeço também pelo carinho e disponibilidade para me ajudar e pela muita paciência que sempre teve.

Não poço deixar de agradecer à Cristiana Gonçalves pela ajuda nos momentos importantes e pelas dicas sempre pertinentes.

À Carina Durães pelos momentos de descontração e pelo apoio e à Marlene Lopes pela ajuda concedida.

Agradeço à Engenheira Madalena Vieira por toda a disponibilidade e ajuda prestada.

A todos os que passaram ou ainda estão no laboratório de fermentações, obrigada pelos momentos divertidos e pelo óptimo ambiente de trabalho.

À Patrícia, que apesar de estar longe, esteve sempre presente nos momentos mais difíceis para me dar animo e ajudar!

À Ana Luísa, pelo apoio constante, paciência nos momentos de “desânimo colectivo” e companheirismo.

Aos meus amigos, por todo o carinho e amizade que sempre demonstraram.

À Ju, que apesar de não estar muito dentro deste assunto, apoiou-me nos momentos mais difíceis e ajudou-me na melhor maneira para organizar e redigir esta tese.

Aos meus pais, um obrigado muito especial por tudo o que fizeram por mim. Agradeço o apoio prestado, o carinho, o incentivo e a enorme paciência.

RESUMO

Biotransformação do óleo de rícino em aromas por *Yarrowia lipolytica*

Os compostos aromáticos produzidos por processos biotecnológicos são cada vez mais aceites pelo mercado consumidor, por serem considerados naturais. Além disso, são processos de grande interesse devido aos elevados rendimentos que apresentam relativamente aos processos de extracção a partir de fontes naturais.

A γ -decalactona é um composto aromático de interesse industrial, que resulta da β -oxidação peroxisomal do ácido ricinoleico. Este ácido gordo, maior constituinte do óleo de rícino, é o precursor mais vulgarmente utilizado na produção biotecnológica deste aroma.

Para que o substrato (óleo de rícino) esteja mais disponível para as células o utilizarem na produção de γ -decalactona, pode utilizar-se óleo de rícino hidrolisado. Esta hidrólise pode ser promovida por acção enzimática, mais especificamente por lipases.

O objectivo geral do presente trabalho consiste na avaliação do papel das lipases, comerciais e produzidas pela levedura, na hidrólise do óleo de rícino e consequente impacto na produção de γ -decalactona.

Inicialmente foi feita a validação do método experimental utilizado para determinar a actividade lipolítica, tendo-se concluído que o método que utiliza como substrato o *p*-nitrofenil laurato não era preciso. Assim, nos ensaios posteriores de determinação da actividade lipolítica foi empregue o substrato *p*-nitrofenil butirato, que forneceu resultados mais precisos.

Realizaram-se ensaios de caracterização da actividade de várias enzimas comerciais solúveis e imobilizadas. Os ensaios tiveram como finalidade avaliar a actividade lipolítica das diferentes enzimas e permitiram concluir que a lipase de *C. rugosa* ($5.873 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}_{\text{enzima}}$) apresenta uma actividade bastante superior à das outras enzimas analisadas, Lipozyme TL IM, Lipolase 100 T e Lipase CALB L.

Com o intuito de estudar quais as condições que conduzem a um maior grau de hidrólise do óleo de rícino realizaram-se ensaios com as diferentes lipases comerciais estudadas, tendo-se variado as condições de temperatura, pH e concentração de óleo de rícino. A maior percentagem de hidrólise (95.37 %) foi obtida quando se utilizou a enzima Lipozyme TL IM, a pH 8 e 27 °C, ao fim de 45 horas.

Nos ensaios de produção de lipase por diferentes estirpes de *Y. lipolytica* observou-se que a produção de enzima é favorecida quando o meio de produção de lipase é adicionado ao meio de crescimento celular, sem ocorrer centrifugação das células na transferência entre meios. Foram comparados vários substratos na indução de lipase e verificou-se que, para a estirpe *Yarrowia lipolytica* W29, foi o ricinoleato de metilo que se revelou o melhor indutor para a produção de lipase, nas condições analisadas.

Nos ensaios de biotransformação do óleo de rícino em γ -decalactona verificou-se que a etapa inicial de hidrólise do óleo não se revelou crucial para o aumento da produtividade. A maior produção de γ -decalactona ($1600 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi obtida usando óleo de rícino não hidrolisado e sem adição de lipase extracelular, sendo que a produtividade foi melhorada pelo aumento da velocidade de agitação.

ABSTRACT

Biotransformation of castor oil in aroma compounds by *Yarrowia lipolytica*

The aromatic compounds produced by biotechnological processes are increasingly accepted by consumers, because they are considered as natural compounds. In addition, they are of great interest due to the high yields obtained comparatively to chemical processes.

γ -Decalactone is an aromatic compound of industrial interest, resulting from the peroxisomal β -oxidation of ricinoleic acid. This fatty acid, the major constituent of castor oil, is the precursor most commonly used in the biotechnological production of this aroma.

In order to increase the availability of the substrate (castor oil) to the cells for the production of γ -decalactone, hydrolyzed castor oil can be used. This hydrolysis can be promoted by enzymatic action, more specifically by lipases.

The main goal of the present work is to assess the role of lipases, both commercial and produced by the yeast, in the hydrolysis of castor oil and the consequent impact on the production of γ -decalactone.

Initially, a validation of the experimental method used to determine the lipolytic activity was developed, and it was concluded that the method using the substrate *p*-nitrophenyl laurate was not accurate. Thus, in the subsequent experiments to determine the lipolytic activity, the substrate *p*-nitrophenyl butyrate was used, providing more accurate results.

Experiments were performed in order to determine the activity of several commercial enzymes, soluble and immobilized. The aim of those essays was to evaluate the lipolytic activity of the different enzymes. The results allowed to conclude that, from all enzymes analyzed, the lipase of *C. rugosa* ($5.873 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}_{\text{enzyme}}$) presents the highest activity.

It was also aim of this work to study the conditions that lead to a greater hydrolysis rate of castor oil. Thus, assays were performed with different commercial lipases previously studied, under different operating conditions, such as temperature, pH and castor oil concentration. The largest percentage of hydrolysis (95.37 %) was achieved when using the enzyme Lipozyme TL IM, at pH 8 and 27 °C, after 45 hours.

In lipase production essays, carried out by different strains of *Y. lipolytica*, lipase production was improved when the components of the production medium were added to the inoculum culture without harvesting and centrifuging cells in the transfer between both media. Different substrates were tested as lipase inducers and it was observed that, for the strain *Yarrowia lipolytica* W29, methyl ricinoleate revealed to be the best lipase inducer, for the conditions tested.

The biotransformation of castor oil into γ -decalactone was not improved by the initial step of oil hydrolysis. The highest production of γ -decalactone ($1600 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) was obtained using non-hydrolyzed castor oil and without adding extracellular lipase. Moreover, the productivity was improved by increased agitation rates.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 O composto aromático γ -decalactona.....	5
2.2 Produção de γ -decalactona: β -oxidação peroxisomal	6
2.3 A levedura <i>Yarrowia lipolytica</i>	8
2.3.1 Metabolitos produzidos por <i>Yarrowia lipolytica</i>	9
2.4 Óleo de rícino	10
2.4.1 Hidrólise enzimática de óleos.....	12
2.5 Lipases	13
2.5.1 Aplicações das lipases	14
2.5.2 Obtenção de lipases.....	15
2.5.3 Formas de produção.....	17
2.5.4 Factores que influenciam a produtividade de lipase	18
2.5.5 Isolamento e purificação de lipase.....	21
2.5.6 Métodos de determinação da actividade.....	22
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Métodos de determinação da actividade de lipase	26
3.1.1 Validação do método.....	26
3.1.2 Quantificação da actividade lipolítica das diferentes enzimas comerciais	29
3.2 Hidrólise do óleo de rícino por lipases	30
3.3 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de <i>Y. lipolytica</i>	31
3.3.1 Leveduras.....	31
3.3.2 Conservação da levedura	31
3.3.3 Meio de crescimento.....	32

3.3.4 Meios e condições de produção de lipase.....	32
3.4 Biotransformação	33
3.4.1 Meio de biotransformação.....	34
3.4.2 Outros meios	34
3.4.3 Efeito da velocidade de agitação.....	35
3.5 Métodos analíticos.....	35
3.5.1 Concentração celular	35
3.5.2 Quantificação da γ -decalactona	36
3.5.3 Quantificação da actividade proteásica	37
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Validação do método	39
4.2 Determinação da actividade lipolítica	43
4.3 Hidrólise do óleo de rícino	46
4.3.1 Efeito das condições experimentais na hidrólise do óleo de rícino	46
4.4 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de <i>Yarrowia lipolytica</i>	53
4.4.1 Comparação de meios e estratégias de arranque na produção de lipase.....	53
4.4.2 Influência de diferentes indutores na produção de lipase	58
4.5- Biotransformação	62
4.5.1 Efeito da composição do meio na produção de γ -decalactona	62
4.5.2 Influência da agitação na produção de γ -decalactona.....	66
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO.....	70
CAPÍTULO 6 - BIBLIOGRAFIA.....	74
ANEXOS	90
A.1 Curvas de Calibração.....	91
A.1.1 Curva de calibração da biomassa.....	91
A.1.2 Curva de calibração do GC.....	92

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 2. 1 - Resumo dos microrganismos produtores de lipase.....	16
Tabela 2. 2 - Métodos de purificação de lipases.	22

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3. 1– Composição do meio YPDA para manutenção das colónias de <i>Yarrowia lipolytica</i> .	31
Tabela 3. 2– Composição do meio de crescimento de <i>Yarrowia lipolytica</i>	32
Tabela 3. 3 – Composição do meio de produção de lipase (YNB/Azeite) para <i>Yarrowia lipolytica</i>	33
Tabela 3.4 – Composição do meio de biotransformação (MB).	34

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 4.1 - Limites de detecção e de quantificação calculados pelo critério de Long e Winefordner (1983) para avaliar o método de determinação da actividade da lipase de <i>C. rugosa</i>	41
Tabela 4. 2 - Precisão do método de determinação da actividade da lipase de <i>C. rugosa</i>	42
Tabela 4. 3 - Valores de actividade específica para as diferentes lipases estudadas. São apresentados os valores médios \pm erro padrão para um intervalo com 95 % de confiança.....	43
Tabela 4. 4 – Valores de actividade lipolítica específica para a enzima Lipozyme TL IM, para as temperaturas de 37 °C e 70 °C. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com n = 3.	45
Tabela 4. 5 – Valores de actividade lipolítica específica para a enzima Lipolase 100 T, para as temperaturas de 37 °C e 55 °C. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com n = 3.	45
Tabela 4. 6 - Percentagem de hidrólise do óleo de rícino para as diferentes condições analisadas (pH, T e concentração de substrato).	51

Tabela 4. 7 - Valores de actividades máximas de lipase e protease extracelular, para as estirpes de <i>Y. lipolytica</i> W29, IMUFRJ 50862 e CBS 2073.	54
Tabela 4. 8 - Valores de actividades totais máximas de lipase e protease, para a estirpe <i>Y. lipolytica</i> W29.	55
Tabela 4. 9 – Valores de produtividade para as diferentes potências de agitação e meios analisados.	68

ANEXOS

Tabela A.1.1 – Expressão das rectas de calibração da biomassa.	91
Tabela A.1.2 – Expressão das rectas de calibração do GC, para cada composto analisado.	92

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 – Bioconversão do ácido ricinoleico em γ -decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i>	7
Figura 2. 2 - Composição do óleo de rícino.....	11

CAPÍTULO 4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 4. 1 - Curva de saturação para a lipase de <i>C. rugosa</i> demonstrando a relação entre a concentração de enzima e a actividade enzimática, para o substrato <i>p</i> -NPL.....	39
Figura 4. 2 – Actividade da lipase de <i>C. rugosa</i> para os ensaios realizados, a diferentes concentrações de enzima. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com n = 3.	40
Figura 4. 3 - Efeito da temperatura (37 °C (◆) e 27 °C (■)) na percentagem de hidrólise do óleo de rícino.....	47
Figura 4. 4 - Efeito do pH (pH 6 (■), pH 7 (▲) e pH 8 (◆)) na percentagem de hidrólise do óleo de rícino, para a temperatura de 37 °C.....	49
Figura 4. 5 - Efeito da concentração de substrato (3 % (p/v) (◆) e 5 % (p/v) (■)) na percentagem de hidrólise do óleo de rícino.	50
Figura 4. 6 – Cinética de produção de lipase durante a cultura de <i>Y. lipolytica</i> W29 em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×): (A) actividade lipolítica extracelular; (B) actividade lipolítica total.....	58
Figura 4. 7 - Cinética da actividade de protease de <i>Y. lipolytica</i> W29 em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×): (A) actividade extracelular de protease; (B) actividade total de protease.....	60
Figura 4. 8 – Evolução do crescimento celular de <i>Y. lipolytica</i> W29 ao longo do tempo em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×).....	61
Figura 4. 9 - Produção de γ -decalactona a 140 rpm, para diferentes composições do meio de biotransformação: Lipase/OR (◆), MB (■), Lipase/ORH (▲) e MB/Azeite (×).	62
Figura 4. 10 - Variação do pH do meio ao longo do tempo: Lipase/OR (◆), Lipase/ORH (■), MB (▲) e MB/Azeite (×).....	64

Figura 4. 11 - Perfis de crescimento da levedura <i>Y. lipolytica</i> W29 para os vários meios testados: Lipase/OR (◆), Lipase/ORH (■), MB (▲) e MB/Azeite (×).....	65
Figura 4. 12 - Produção de γ -decalactona a 240 rpm, para diferentes composições do meio de biotransformação: Lipase/OR (◆), MB (■), Lipase/ORH (▲) e MB/Azeite (×).....	66

LISTA DE SÍMBOLOS

$A_{###}$ nm	Absorvância a ### nm
ΔAbs	Varição da absorvância
$A_{\gamma\text{-decalactona}}$	Área de γ -decalactona
$A_{\gamma\text{-undecalactona}}$	Área de γ -undecalactona
C	Concentração celular ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_{oleo}	Concentração de óleo na amostra
DO	Densidade óptica (nm)
DSMO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
FID	Flame ionization detector (Detector de ionização de chama)
GC	Gas Chromatography (Cromatografia gasosa)
GRAS	Generally Regarded As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)
I_s	Índice de saponificação do óleo
K	Coefficiente de resposta
KOH	Hidróxido de potássio
Lipase/OR	Meio em que se adiciona lipase extracelular, sem efectuar a hidrólise prévia do óleo de ricino
Lipase/ORH	Meio em que se adiciona lipase extracelular, onde se efectua a hidrólise prévia do óleo de ricino
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
M	Molaridade ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
MB/Azeite	Adição prévia do meio com azeite ao meio de biotransformação
MB	Meio de biotransformação
MM	Massa molar ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)
$p\text{-NPL}$	p -nitrofenil laurato

p -NPB	p -nitrofenil butirato
rpm	Rotações por minuto
t	Tempo
Δt	Variação de tempo
T	Temperatura (°C)
TCA	Ácido tricloroacético
Tween 80	Polioxietileno monooleato de sorbitana
V_t	Volume reaccional total
V_a	Volume de amostra
V	Volume
YNB	Yeast Nitrogen Base
YNB/Azeite	Meio YNB com adição de azeite
YNB/OR	Meio YNB com adição de óleo de rícino
YNB/RM	Meio YNB com adição de ricinoleato de metilo
YNB/B	Meio YNB
[γ -decalactona]	Concentração de γ -decalactona
[γ -undecalactona]	Concentração de γ -undecalactona

LETRAS GREGAS

ε	Coeficiente de extinção molar do p -nitrofenol (mM^{-1})
---------------	---

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO



Neste capítulo é apresentada uma contextualização ao tema do trabalho, assim como a apresentação dos seus principais objectivos.

A produção de aromas por via biotecnológica tem-se revelado de grande interesse, uma vez que a aceitabilidade destes produtos para uso na indústria alimentar é bastante maior do que a dos produtos análogos obtidos por síntese química. Como os produtos derivados de processos biotecnológicos a partir de substratos naturais são, em princípio considerados “naturais”, caso já tenham sido identificados em plantas ou em outras fontes naturais, surge assim um forte interesse na produção biotecnológica destes compostos (Schrader *et al.*, 2004).

Além disso, a ideia crescente de que o “natural” é preferível ao “artificial”, provocou um aumento da procura dos compostos aromáticos produzidos por via biotecnológica. A γ -decalactona, composto aromático, é um deste tipo de produtos que pode ser obtido através da biotransformação de lípidos por microrganismos. A levedura *Yarrowia lipolytica* é capaz de levar a cabo esta transformação do óleo de rícino em aroma (Waché *et al.*, 1998). Além disso, é capaz de induzir a produção de lipases, que são enzimas de grande relevo na hidrólise do óleo de rícino.

As lipases são enzimas muito versáteis uma vez que têm a capacidade de catalisar reacções tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Além disso, o elevado potencial de aplicação das lipases é justificado pela sua capacidade de utilização numa ampla gama de substratos, estabilidade à temperatura, pH e solventes orgânicos (Hasan *et al.*, 2006).

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras constitui uma alternativa que procura superar os inconvenientes associados aos processos físico-químicos, uma vez que com a utilização de lipases as reacções podem ser levadas a cabo em condições amenas de temperatura e pressão, sendo possível obter produtos com baixo custo energético (Gandhi, 1997; Gustone, 1999; Castro *et al.*, 2004).

O processo de biotransformação do ácido ricinoleico em γ -decalactona pela levedura *Y. lipolytica* está bem documentado em termos de vias metabólicas (β -oxidação peroxisomal), interacções lípidos-células e efeito do aroma nas células (Aguedo, 2002). No entanto, ficam por esclarecer alguns passos cruciais que controlam a razão entre o aroma produzido e outras lactonas não-aromáticas. Contudo, como estes compostos estão presentes no meio fermentativo em baixas concentrações, o processo de produção torna-se bastante caro. Além disso, a elevada volatilidade e a baixa solubilidade em água de alguns compostos aromáticos, dificulta a obtenção biotecnológica de aromas a nível industrial (Hanssen, 1989).

O objectivo central do presente trabalho consiste no desenvolvimento de estratégias de aumento da produtividade do processo de produção de aromas por via biotecnológica, em particular da produção de γ -decalactona, através da biotransformação de ácido ricinoleico (proveniente do óleo de rícino) catalisada pela levedura *Yarrowia lipolytica*.

Numa fase inicial, pretende-se determinar a actividade de várias enzimas comerciais e produzidas pela levedura, optimizando os meios de produção de lipase, uma vez que estas serão posteriormente utilizadas na hidrólise do óleo de rícino.

Ensaio posteriores visam optimizar a hidrólise do óleo de rícino por acção enzimática, mais especificamente por lipases, onde serão empregues as enzimas comerciais previamente estudadas.

Posteriormente, integrar-se-á a fase de hidrólise no processo de biotransformação do óleo de rícino em γ -decalactona, de modo a maximizar a produtividade do aroma, comparando a produção de γ -decalactona, por *Y. lipolytica*, a partir de óleo de rícino e de óleo de rícino hidrolisado.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



Numa primeira fase deste capítulo é apresentada uma descrição do composto aromático γ -decalactona, assim como da levedura utilizada para o produzir, *Yarrowia lipolytica*.

Reporta-se ainda a via de produção da γ -decalactona e alguns aspectos relevantes do óleo de ricino, substrato utilizado no processo de produção do aroma.

Por fim, devido à importância das lipases no processo de hidrólise do óleo de rícino, referem-se alguns aspectos relevantes destas enzimas.

2.1 O composto aromático γ -decalactona

2.2 Produção de γ -decalactona: β -oxidação peroxisomal

2.3 A levedura *Yarrowia lipolytica*

2.4 Óleo de rícino

2.5 Lipase

2.1 O composto aromático γ -decalactona

Os compostos aromáticos, especialmente as lactonas, são muito utilizados na indústria alimentar. As lactonas são moléculas constituídas por um ciclo carbonado com um átomo de oxigénio, que resultam de uma ciclização de um ácido hidroxilado. Estes compostos são muito atractivos para a indústria alimentar uma vez que possuem um aroma frutado muito característico e podem ser encontrados naturalmente numa vasta variedade de alimentos (frutas, leite e seus derivados, carnes e alguns alimentos fermentados) (Gomes, 2005).

Durante muito tempo, estes compostos foram obtidos directamente a partir de frutos ou por síntese química. No entanto, nos últimos anos tem-se verificado um aumento da utilização de microrganismos e enzimas para a produção natural de compostos aromáticos (Endrizzi, 1993).

A lactona mais importante para aplicação aromática é a γ -decalactona com um volume de mercado de centenas de toneladas por ano (Schrader, 2004). Possui um aroma a pêssego, com um odor muito persistente e um sabor muito forte a pêssego em concentrações abaixo dos 5 mg·L⁻¹. No início dos anos 80, a γ -decalactona natural era um composto aromático extremamente caro e raro (preço > US\$ 10000 Kg⁻¹). No entanto, com a introdução e optimização da produção deste composto por via microbiana, verificou-se uma descida de preço para cerca de US\$ 300 Kg⁻¹, com um volume de mercado anual de várias toneladas (Schrader, 2004).

A produção biotecnológica de γ -decalactona utiliza o ácido ricinoleico, que é o principal ácido gordo constituinte (cerca de 86 %) do óleo de rícino. Okui *et al.* (1963) observaram a produção de γ -decalactona a partir daquele ácido por leveduras do género *Candida*. O ácido ricinoleico é degradado por quatro ciclos sucessivos da β -oxidação em ácido-4-hidroxicanóico que lactoniza originando γ -decalactona (Gatfield, 1993).

Apesar de vários microrganismos serem capazes de produzir compostos de lactonas, os processos que envolvem a levedura *Yarrowia lipolytica* são os que obtêm maiores concentrações de produto. Nicaud *et al.* (1996) utilizaram uma estirpe geneticamente modificada de *Yarrowia lipolytica*, auxotrófica em relação ao uracilo, designada P01D, obtendo assim uma produção elevada de γ -decalactona a partir de ricinoleato de metilo. No final da fase de crescimento,

transferiram a biomassa concentrada para um meio de biotransformação com concentração limitada de uracilo. Após 75 horas, obtiveram $9.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de γ -decalactona.

No entanto, foi já reportado um processo de produção que permite alcançar a produção de $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de γ -decalactona em 55 horas, tendo como substrato óleo de rícino em bruto, e sem utilizar uma estirpe geneticamente modificada (Schrader, 2004).

O mesmo processo foi levado a cabo com outros organismos, tais como *Monilia fructicola*, *Sporobolomyces odoratus* e *Rhodotorula glutinis* mas os rendimentos de produto obtidos foram muito inferiores (Schrader, 2004).

A produção de γ -decalactona foi estudada com diferentes espécies de *Sporidiobolus*, como *Sporidiobolus salmonicolor*, *Sporidiobolus ruinenii*, *Sporidiobolus johnsonii* e *Sporidiobolus pararoseus* (Dufossé *et al.*, 1998). Estas estirpes revelaram-se muito sensíveis à γ -decalactona, no entanto, a forma aberta, isto é, o ácido-4-hidroxicanónico, revelou-se menos tóxico para as leveduras. As concentrações de γ -decalactona obtidas em fermentações que utilizam estas leveduras foram sempre muito baixas ($< 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Cardillo *et al.* (1989) descreveram o processo de produção de γ -decalactona a partir da hidrólise do óleo de rícino utilizando *Aspergillus niger*, *Pichia etchellsii* ou *Cladosporium suavelens*. Em todos os processos descritos as concentrações de γ -decalactona obtidas foram muito baixas ($< 1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Kümin e Münch (1997) usaram *Mucor circillenioides* em decanoato de etilo como substratos para a produção de γ -decalactona. Reportaram uma produção de 10.5 g de γ -decalactona $\cdot\text{L}^{-1}$ após 60 horas.

2.2 Produção de γ -decalactona: β -oxidação peroxisomal

A possibilidade de produzir lactonas por via biotecnológica foi descrita pela primeira vez em 1960, pelo grupo de Okui, aquando do estudo do catabolismo em vários organismos (Okui, 1963).

A produção de γ -decalactona por leveduras a partir de ácidos gordos é um processo muito descrito na literatura; no entanto, o conhecimento sobre o mecanismo envolvido neste processo é muito escasso.

A produção de γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica*, a partir do ácido ricinoleico, foi inicialmente referida num processo patenteado por Farbood e Willis (1983). Muitas foram as vias de produção propostas para o catabolismo da γ -decalactona e do ácido 4-hidroxi-decanóico. Fuganti (1991) propôs uma via de degradação envolvendo a α -oxidação e uma posterior β -oxidação. Por sua vez, Shimizu (1992), observou a produção de lactonas capazes de hidrolisar ácidos gordos.

Nas leveduras, a degradação do ácido ricinoleico em ácido 4-hidroxi-decanóico, precursor da γ -decalactona, é levada a cabo pelas enzimas da β -oxidação peroxissomal (Aguedo *et al.*, 2004) (Figura 2.1). A β -oxidação é um sistema de oxidações cíclicas de ácidos gordos, que compreende quatro reacções catalisadas por enzimas, entre as quais se destaca a acil-CoA, que controla a etapa chave deste processo (Pagot, 1998).

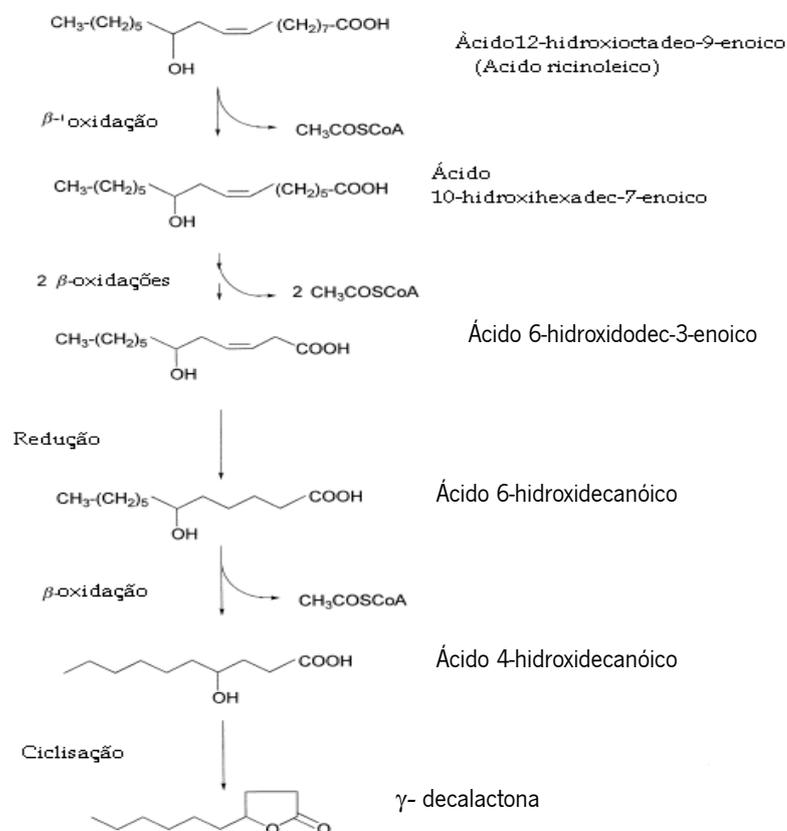


Figura 2.1– Bioconversão do ácido ricinoleico em γ -decalactona por *Yarrowia lipolytica* (adaptado de Schrader *et al.*, 2004).

A *Y. lipolytica* é uma levedura que exibe um elevado rendimento de produção de γ -decalactona, decorrente da peculiaridade de possuir um grande número de genes que codificam para a produção de enzimas especializadas na degradação de substratos hidrofóbicos. Esta espécie possui uma família de cinco acil-CoA oxidases (Aox1p a Aox5p, codificadas pelos genes POX1 a POX5), a enzima que catalisa a primeira reacção da β -oxidação (Aguedo *et al.*, 2004). A descodificação do papel de cada uma destas enzimas é de grande importância para otimizar a produção do composto aromático γ -decalactona.

2.3 A levedura *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um microrganismo aeróbio, eucariótico, do reino Fungi, pertencente à classe dos Ascomycetes, subclasse Hemiascomycetes, sendo inicialmente conhecida como *Candida lipolytica* (Barth e Gaillardin, 1997).

Esta levedura é uma das espécies mais utilizada industrialmente para a produção de ácido cítrico e aroma a pêssego, uma vez que não é considerada patogénica, tendo até adquirido o estatuto GRAS (Beckerich *et al.*, 1998 e Holzschu *et al.*, 1979).

A *Yarrowia lipolytica* é uma das leveduras não convencionais mais estudadas (a classificação “não convencional” foi inicialmente utilizada para diferenciar este grupo de leveduras das mais frequentemente utilizadas, as “convencionais”, e bem estudadas, *Saccharomyces cerevisiae* e, com algumas restrições, *Schizosaccharomyces pombe*) (Barth e Gaillardin, 1997).

Esta estirpe é capaz de utilizar como fontes de carbono a glucose, álcoois, acetato e substratos hidrofóbicos, como ácidos gordos ou alcanos, o que a torna muito atractiva do ponto de vista industrial. No entanto, a sacarose não é referida como substrato metabolizável por esta levedura (Barth e Gaillardin, 1997).

A *Yarrowia lipolytica* é uma levedura que exibe dimorfismo, ou seja, é capaz de alternar, reversivelmente, entre duas formas morfológicas distintas: células típicas de levedura (ovais) ou hifas (Kawasse *et al.*, 2003).

A morfologia das colónias pode ser determinada pelas condições de crescimento, tais como arejamento, fonte de carbono e azoto, pH e pelas características genéticas da estirpe (Kawasse *et al.*, 2003).

Esta levedura é capaz de crescer em ricinoleato de metilo produzindo várias lactonas, entre as quais a γ -decalactona (Waché *et al.*, 2002).

2.3.1 Metabolitos produzidos por *Yarrowia lipolytica*

A levedura *Yarrowia lipolytica* é um microrganismo capaz de secretar vários metabolitos de interesse, entre os quais se podem destacar ácido cítrico (Levinson *et al.*, 2007), proteases (Kulkarni e Gadre, 1999), lipases (Fickers *et al.*, 2003) e lactonas (Aguedo *et al.*, 2005).

2.3.1.1 Proteases

Entre os vários produtos secretados pela levedura *Yarrowia lipolytica* encontram-se as proteases, enzimas que são geralmente secretadas numa fase avançada do crescimento da levedura.

A protease mais excretada por esta levedura é a protease alcalina extracelular. Ogrzydziak (1988) verificou que estirpes de *Y. lipolytica* que cresciam em meio YPD a pH 6.8, secretavam grande quantidade (1 - 2 g·L⁻¹) de protease alcalina, enquanto que a pH 4.0 é detectada no meio actividade de uma protease ácida.

Lopes *et al.* (2008) investigaram a produção de proteases pela levedura *Yarrowia lipolytica*, tendo verificado que durante as primeiras horas de cultura a actividade de protease foi reduzida, aumentando gradualmente até ao final do tempo de cultura, sugerindo assim que a diminuição do pH do meio favorece a produção de protease ácida pela levedura.

2.3.1.2 Lipases

A produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* não tem sido muito reportada na literatura quando comparada com a produção deste metabolito por outros microrganismos.

A produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* foi inicialmente descrita por Peter e Nelson (1948), tendo observado uma actividade lipolítica óptima para pH 6.2 - 6.5.

Pignede *et al.* (2000) descrevem o gene LIP2 como sendo o responsável por toda a lipase extracelular da estirpe *Y. lipolytica* W29.

Trabalhos posteriores desenvolvidos por Ota *et al.* (1982) reportam um incremento da actividade lipolítica extracelular em culturas suplementadas com uma fracção proteica derivada de grãos de soja.

Estudos preliminares com seis leveduras diferentes, utilizando azeite como indutor, demonstraram que a produção de lipase extracelular por *Yarrowia lipolytica* 681 foi superior à produção por *Yarrowia lipolytica* 179, *Candida rugosa* ATCC 14830 e *Candida utilis* CDBBC245 (Corzo e Revah, 1999).

O mecanismo proposto para a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* foi descrito por Pereira-Meirelles *et al.* (2000). Durante as primeiras horas do processo produtivo detecta-se apenas uma pequena quantidade de lipase, uma vez que a produção de lipase é induzida pela quantidade de lípidos presentes no meio de cultura. Assim, as moléculas da enzima são direccionadas para a superfície da célula, onde permanecem preferencialmente, até que aproximadamente 50 % do substrato seja consumido. A lipase começa então a ser libertada para o meio de cultura, sendo que a actividade lipolítica extracelular máxima é obtida durante a fase estacionária de crescimento. No final da fermentação é apenas detectada uma pequena actividade lipolítica decorrente da lipase basal que permanece no interior da célula.

2.4 Óleo de rícino

O óleo de rícino é um triglicerídeo de ácidos gordos que pode ser obtido a partir das sementes da planta *Ricinus communis*, muito característica do Brasil e da Índia.

O óleo de rícino, cuja composição aproximada se apresenta na figura 2.2, é muitas vezes descrito como um triglicerídeo de ácido ricinoleico. Este óleo vegetal é o único proveniente de fonte renovável, disponível comercialmente, que contém grupos hidroxilo funcionais, decorrentes da elevada percentagem de ácidos gordos (Sharon *et al.*, 1998).

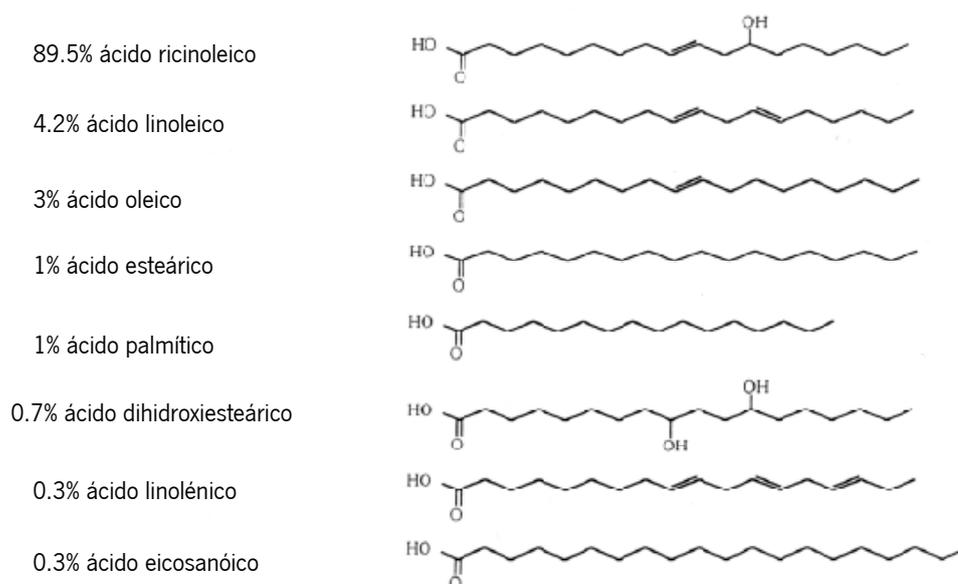


Figura 2. 2 - Composição do óleo de rícino.¹

O ácido ricinoleico tem sido muito utilizado como corante para tintas de impressão, sendo também aplicado nos sabonetes de limpeza a seco. Contudo, a sua utilização principal é como intermediário químico para produzir diversos oleoquímicos, entre os quais se destacam: ricinoleato de metilo, ácido ricínico e álcool ricinoleico. Estes compostos têm sido muito utilizados na produção de plásticos, emulsionantes, sabonetes, entre outros (Puthli *et al.*, 2006).

A elevada pressão e temperatura características dos processos de produção de ácidos gordos, não são adequadas para o óleo de rícino, por causa das esterificações intermoleculares do ácido ricinoleico, que conduzem à formação de estolides (Puthli *et al.*, 2006).

Assim, o ácido ricinoleico é geralmente produzido por saponificação seguida de acidificação. Embora as condições de reacção sejam muito mais amenas comparativamente à hidrólise de alta pressão para os outros óleos, o ácido ricinoleico produzido por este método possui um odor e coloração característicos. Além disso, a reacção produz uma elevada quantidade de subproduto, Na_2SO_4 .

A hidrólise enzimática do óleo de rícino surge assim como uma alternativa que pode ser usada com sucesso para superar as desvantagens dos métodos convencionais (Puthli *et al.*, 2006). As hidrolases são as enzimas responsáveis por esta transformação, sendo a subclasse das lipases a de maior relevância para o presente trabalho.

¹ Retirado de <http://www.groshea.com/>, acedido em 14/9/2009

2.4.1 Hidrólise enzimática de óleos

A hidrólise de óleos e gorduras é uma reacção de equilíbrio e caracteriza-se por um aumento gradual da velocidade de reacção. Os principais factores que podem afectar esta reacção são a temperatura, tipo de catalisador, teor em água do meio reaccional e a concentração de glicerol libertado para a fase aquosa (Dieckelmann e Heinz, 1988).

Os processos convencionais de hidrólise de óleos e gorduras utilizam pressões e temperaturas elevadas na presença de catalisadores inorgânicos, conduzindo assim a um elevado consumo energético, aliado à formação de vários subprodutos indesejados. Por sua vez, os processos enzimáticos, onde as reacções podem ser conduzidas a pressões e temperaturas inferiores na presença de um biocatalisador, proporcionam um menor consumo energético, minimizando assim a degradação térmica dos produtos e permitindo a recuperação e concentração das moléculas de interesse (Castro *et al.*, 2004; Hasan *et al.*, 2006).

Na hidrólise enzimática de óleos e gorduras é necessária a formação de uma interface óleo/água e a absorção da enzima nessa interface, podendo para isso serem utilizadas enzimas livres ou imobilizadas, em sistemas agitados ou na presença de solventes orgânicos (Sharma *et al.*, 2001; Brigida *et al.*, 2007).

Assim, são diversos os parâmetros que podem influenciar o grau de hidrólise de óleos e gorduras e, conseqüentemente, várias técnicas têm sido utilizadas para aumentar a taxa de hidrólise de gorduras utilizando lipases como catalisadores.

A concentração inicial de reagentes determina a extensão de uma reacção. Assim, Rooney e Weatherley (2001) estudaram a relação entre a velocidade de hidrólise e a quantidade de água presente no meio, tendo obtido uma percentagem de hidrólise de 90 % e 72 %, quando utilizaram uma emulsão óleo:água na proporção de 3:1 e 8:1, respectivamente. Portanto, quanto menor for a razão óleo:água, maior será o grau de hidrólise obtido.

A incorporação de solventes no meio reaccional também tem sido descrita como um factor responsável pelo aumento das taxas de hidrólise dos triglicerídeos. Mukataka *et al.* (1985) testaram diferentes solventes no processo de hidrólise de óleos em sistemas com emulsão e seleccionaram o iso-octano como o mais adequado.

Wang *et al.* (1988) verificaram que a hidrólise de azeite catalisada pela lipase de *Candida rugosa* num sistema emulsionado apenas por agitação mecânica apresentou taxas de

hidrólise similares às obtidas nos sistemas reaccionais em que era adicionado um agente emulsionante.

A hidrólise do óleo de palma foi investigada para obtenção de mono e diglicerídeos utilizando lipases de origem microbiana (*Candida rugosa*), vegetal (gérmen de trigo) e animal (pâncreas de porco). Das várias lipases testadas, a maior percentagem de conversão foi obtida com a lipase de *Candida rugosa*, com actividade óptima a 37 °C e pH = 7.56 (Khor *et al.*, 1986).

Linfield *et al.* (1984) estudaram a hidrólise de varias gorduras e azeite utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. As reacções decorreram em frascos agitados, obtendo-se elevadas percentagens de conversão (97 - 99 % em 72 horas).

A hidrólise de óleo de soja com diferentes tipos de lipase foi estudada por Park *et al.* (1988) tendo como principal objectivo a comparação das actividades dessas enzimas em sistemas isolados e combinados. Após 10 h de reacção, verificaram que os sistemas combinados de lipases microbianas forneceram rendimentos mais elevados (98 % e 99.5 % de hidrólise) que os obtidos em sistemas contendo apenas uma lipase (7.2 % e 44.4 % de hidrólise).

2.5 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas pertencentes à família das hidrolases que têm como principal função biológica catalisar a hidrólise de triglicerídeos insolúveis para gerar ácidos gordos livres, mono e diglicerídeos e glicerol. Além da sua função natural, as lipases podem catalisar reacções de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não-aquoso (Houde *et al.*, 2004). As lipases são distintas das outras esterases, pois actuam de forma única em substratos insolúveis em água, actuando na interface óleo-água de soluções emulsionadas (Sharma *et al.*, 2001). Além disso, as lipases microbianas são biocatalisadores de grande valor devido sobretudo a características como estabilidade na presença de solventes orgânicos, ausência da necessidade da adição de co-factores e actuação sob condições amenas (Snellman *et al.*, 2002).

2.5.1 Aplicações das lipases

O interesse por microrganismos produtores de lipase tem crescido nos últimos anos, verificando-se uma intensa procura por novas fontes de enzimas, uma vez que a maioria destas enzimas é produzida extracelularmente, permitindo assim uma diminuição dos custos de produção e processamento (Sharma *et al.*, 2001).

A grande versatilidade das lipases faz com que estas possuam um vasto potencial de aplicação nomeadamente na indústria alimentar, de detergentes, farmacêutica, de couro, têxtil, cosmética, papelaria e de síntese orgânica (Sharma *et al.*, 2001).

Na indústria alimentar, as lipases de origem microbiana têm sido utilizadas para obtenção de ácidos gordos livres a partir da hidrólise de óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Já na produção de queijos, as lipases têm sido empregues para alterar e intensificar o sabor dos queijos e acelerar o processo de maturação. Além disso, estas ainda podem ser utilizadas para remover gordura dos produtos de carnes e do peixe (Kazlauskas e Bornscheuer, 1998).

A utilização de lipases na hidrólise de gorduras a nível industrial permite diminuir os gastos energéticos e minimizar a degradação térmica de compostos, quando comparados com os processos tradicionais (Sharma *et al.*, 2001).

Um dos campos de maior aplicação das lipases a nível comercial é a indústria dos detergentes, devido principalmente à sua capacidade de hidrolisar gorduras. No entanto, as lipases utilizadas na formulação de detergentes devem apresentar características específicas tais como: baixa especificidade para o substrato (permitindo uma actuação mais diversificada sobre óleos e gorduras), estabilidade nas condições de lavagem (pH entre 10 e 11 e temperatura dos 30 °C aos 60 °C); e por fim, devem ainda ser resistentes aos outros componentes da formulação e à degradação causada pelas enzimas proteolíticas presentes (Yeoh *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1995).

A utilização de lipases no tratamento de efluentes é uma nova área de aplicação destas enzimas, que se tem revelado de grande interesse e com grandes potencialidades. O derrame de óleos em oceanos, rios e em grandes áreas terrestres tem sido um problema constante da actualidade, sendo que as lipases surgem como uma excelente alternativa para a resolução destes desastres ambientais (Hasan *et al.*, 2006).

As lipases são também muito utilizadas nos sistemas de tratamento de lamas activadas e em outros reactores aeróbios, onde removem de forma contínua as gorduras presentes na superfície do reactor, permitindo assim um transporte mais eficiente de oxigénio para o meio (Hasan *et al.*, 2006).

É no entanto necessário salientar que as aplicações de lipases referidas anteriormente são apenas a título ilustrativo, e que estão em número bastante diminuto em relação às potenciais aplicações futuras destas enzimas.

2.5.2 Obtenção de lipases

As lipases podem ser produzidas por diversos microrganismos e células eucariotas superiores, sendo que a forma tradicional de obtenção era através do pâncreas de animais. No entanto, as dificuldades de acesso ao material de origem animal levaram a um aumento do interesse pelas lipases produzidas por via microbiana (Hasan *et al.*, 2006). Os microrganismos produtores de lipase incluem bactérias, fungos e leveduras. Alguns desses microrganismos podem ser encontrados na tabela 2.1 (Sharma *et al.*, 2001).

As lipases provenientes de microrganismos constituem um grupo de enzimas com grande aplicação biotecnológica, devido à versatilidade das suas propriedades, principalmente no que se refere à facilidade de produção em massa, à actuação enzimática e especificidade do substrato, sendo um dos grupos de compostos mais utilizados para produção industrial (Hasan *et al.*, 2006).

Tabela 2. 1 - Resumo dos microrganismos produtores de lipase (adaptado de Sharma *et al.*, 2001).

Bactérias	<i>Bacillus megaterium</i>	Godtfredsen (1990)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Kennedy e Rennarz (1979)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aoyama <i>et al.</i> (1988); Hou (1994)
Fungos	<i>Rhizopus delemar</i>	Klein <i>et al.</i> (1990)
	<i>Aspergillus niger</i>	Chen <i>et al.</i> (1995)
Leveduras	<i>Candida rugosa</i>	Wang <i>et al.</i> (1995) ; Frense <i>et al.</i> (1996)
	<i>Humicola lanuginosa</i>	Ghosh <i>et al.</i> (1996); Takahashi <i>et al.</i> (1998)
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Merek e Bednasski (1996)
	<i>Pichia bispora</i>	Hou (1994)
	<i>Saccharomyces lipolytica</i>	Tahoun <i>et al.</i> (1985)
	<i>Torulospora globora</i>	Hou (1994)
	<i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parakrusei</i> , <i>C. pseudotripicalis</i> , <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. tropicalis</i>	Farbood e Willis (1983); Farbood <i>et al.</i> (1990)
	<i>Cladosporium suavolens</i>	Cardillo <i>et al.</i> (1991)
	<i>Geotrichum fragrans</i> , <i>Geotrichum sp.</i>	Neto <i>et al.</i> (2004)
	<i>Hansenula saturnus</i>	Farbood e Willis (1983); Meyer (1993)
	<i>Pichia etchellsii</i>	Cardillo <i>et al.</i> (1990)
	<i>Pichia guilliermondii</i>	Pagot (1997); Endrizzi-Joran (1994)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gatfield (1995); Boog <i>et al.</i> (1990); Ambid <i>et al.</i> (1999)
	<i>Sporidiobolus ruinenii</i> , <i>Sp. pararoseus</i> , <i>Sp. Johnsonii</i>	Feron (1993)
	<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	Endrizzi-Joran (1994); Feron (1993)
	<i>Sporobolomyces odoratus</i>	Cheetham <i>et al.</i> (1988; 1993); Lee e Chou (1994); Haffner e Tressl (1996); Ambid <i>et al.</i> (1999)

2.5.3 Formas de produção

A produção de lipases microbianas pode ser obtida por fermentação submersa ou por fermentação em estado sólido (Sharma *et al.*, 2001). Esta última apresenta a vantagem de poderem ser utilizados resíduos e sub-produtos das agro-indústrias, o que permite uma diminuição dos custos de produção, sendo preferencialmente utilizada para culturas de fungos (Cavalcanti *et al.*, 2005), podendo também ser aplicada a culturas de leveduras, como por exemplo a *Y. lipolytica* (Babu e Rao, 2007).

A fermentação submersa tem como principal característica a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, sendo o processo mais utilizado para a produção de lipases (Ito *et al.*, 2001).

Este tipo de sistemas de produção de lipases pode ser efectuado em matrizes agitadas, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. Contudo, os processos efectuados em matrizes agitadas apresentam alguns problemas, nomeadamente no controlo de certos parâmetros, tais como o arejamento, que é um factor de grande importância nos processos de produção de lipases (Elibol e Ozer, 2001; Mahadik *et al.*, 2002; Asther *et al.*, 2002).

A fermentação submersa é uma técnica de cultura que apresenta inúmeras vantagens, tais como uma maior homogeneidade do meio e facilidade de controlo dos parâmetros do processo. No entanto, neste tipo de processos a probabilidade de contaminação é maior, devido principalmente à grande quantidade de água existente (Couto e Saromán, 2006).

Como já foi referido anteriormente, muitos são os microrganismos capazes de produzir lipase (Tabela 2.1), sendo necessária a optimização e controlo das condições de fermentação de acordo com o sistema utilizado. Uma vez que as lipases microbianas são geralmente extracelulares, sendo excretadas pela membrana para o meio de cultura (Wooley e Peterson, 1994), as etapas de recuperação e purificação da enzima são também etapas de grande importância no processo global de produção.

2.5.4- Factores que influenciam a produtividade de lipase

A produção de lipase pode ser influenciada por diversos factores, entre os quais se destacam o tipo e concentração da fonte de carbono e de azoto, o pH, a temperatura de crescimento e a concentração de oxigénio dissolvido no meio (Elibol e Ozer, 2001).

- **Fonte de carbono**

A produção de lipases é fortemente afectada pela fonte de carbono utilizada no meio de cultura. Como fonte de carbono para a produção de lipases são mais utilizados os carboidratos, ácidos gordos, glicerol, outros álcoois e ácidos orgânicos (Hadeball, 1991). Barth e Gaillardin (1997) referem ainda o uso de glucose, álcoois, alcanos e acetato como fontes de carbono.

Sigihara *et al.* (1991) observaram a produção de lipase por *Bacillus sp.* na presença de 1 % de azeite no meio de cultura. Após cultura prolongada e na ausência de azeite, é detectada uma pequena actividade enzimática.

A frutose e o óleo de palma são referidos como a melhor fonte de carbono e de lípidos, respectivamente, para a produção de uma lipase extracelular por *Rhodotorula glutinis* (Sharma, 2001).

Uma actividade específica de 7395 U·mg⁻¹ de proteína é observada numa lipase produzida por *P. fluorescens* num meio que contém, como fonte de carbono, azeite (Lee *et al.*, 1993).

Gão e Breuil (1995), verificaram que um aumento do nível da actividade lipolítica era possível se se utilizassem óleos vegetais como fonte de carbono, sendo que a produtividade máxima ocorria quando se utilizava azeite.

Na produção de lipases por *Candida rugosa*, em sistema descontínuo, foi observado que a produção da enzima era afectada pela concentração inicial de ácido oleico. Assim, a concentração máxima de lipase era obtida quando se utilizava uma concentração de ácido oleico de 2 g·L⁻¹, sendo que este valor diminuía para concentrações mais elevadas de ácido oleico (Gordillo *et al.*, 1995).

- **Fonte de azoto**

A fonte de azoto utilizada para a produção de enzimas lipolíticas tem-se revelado um factor de grande importância. Dos vários compostos azotados usados para a produção de lipase, as fontes mais utilizadas são a farinha de soja, peptonas, aminoácidos, ureia, nitratos e sais de amónia (Hadeball, 1991; Montesinos *et al.*, 1996). Geralmente os microrganismos atingem altos rendimentos na produção de lipase quando se utiliza como fonte de azoto um composto orgânico (Sharma *et al.*, 2001).

Fickers *et al.* (2003) utilizaram peptona como fonte de azoto para a produção de lipase por mutantes de *Y. lipolytica*.

O microrganismo *Cremonium structum* produz grande quantidade de lipase num meio que contem 35 % de óleo de girassol como fonte de azoto (Sharma *et al.*, 2001).

Por sua vez, Pokorny *et al.* (1994) observou que a produção de lipase aumentava quando o meio de cultura era suplementado com uma fonte de azoto inorgânico.

- **Íões metálicos**

O efeito da presença de íões metálicos no meio de cultura também se revela um factor de grande importância para a produção de enzimas lipolíticas.

Janssen *et al.* (1994) verificaram que a produção de lipase por *Bacillus sp.* era incrementada quando se adicionavam ao meio os íões magnésio, cálcio e ferro. Por sua vez Pokorny *et al.* (1994) reportaram que a produção de lipase por *A. niger* é melhorada na presença de íões magnésio.

Kok *et al.* (1995) observaram que a produção de uma lipase extracelular por *Acinetobacter calcoaceticus* é aumentada quando são adicionados ao meio os íões cálcio, magnésio e cobre.

- **Efeito do pH e da temperatura**

As reacções biológicas são fenómenos dependentes tanto do pH como da temperatura.

Os valores adequados de temperatura e pH para a produção de lipase são entre 27 °C e 30 °C e quanto ao valor de pH, este deve ser mantido próximo à neutralidade ou ligeiramente ácido (5.5 a 7.0) (Pereira-Meirelles *et al.*, 1997).

Sharon *et al.* (1998a) estudaram o efeito do pH e da temperatura na produção de lipase por *Pseudomonas aeruginosa*. A enzima produzida por este microrganismo apresentou uma actividade máxima para um pH de 8.5.

Os ensaios realizados por Destain *et al.* (1997) demonstraram que a actividade enzimática de *Y. lipolytica* CBS 6303 era máxima a pH 7 e 37 °C.

- **Efeito do arejamento**

A presença de oxigénio no meio é um factor essencial para a produção de lipase, principalmente se o microrganismo produtor for aeróbio, como é o caso da levedura *Y. lipolytica*, onde o oxigénio é utilizado como aceitador final de electrões, re-oxidando moléculas na cadeia respiratória (Amaral, 2003).

Giuseppin (1984) verificou que a produção de lipases por *Rhizopus delemar* é influenciada pela concentração de oxigénio no meio de cultura. Elevadas concentrações de oxigénio no meio resultam num aumento da concentração de lipase. No entanto, contrapondo estes resultados estão os trabalhos de Giuseppin (1984) e de Genovefa *et al.* (1994) que descrevem que um aumento das condições de arejamento do meio conduzem a uma diminuição na produção de lipase por *Staphylococcus carnosus*.

Long *et al.* (1996) observaram que um aumento nos níveis de arejamento do meio provocava uma diminuição na produção de lipase por *Aspergillus flavus*.

A produção de lipase com aplicação de pressões elevadas, o que implica, condições de transferência de oxigénio superiores, foi estudada por Lopes (2007). Através deste estudo foi possível concluir que o aumento da pressão total de ar, e conseqüentemente da transferência de oxigénio, se traduziu num incremento da actividade enzimática.

- **Presença de indutores**

A adição de determinadas substâncias ao meio de produção pode incrementar a produção de lipase. Azeite, trioleína, outros óleos vegetais, ácidos gordos, surfactantes e activadores produzidos pelo próprio microrganismo, são algumas das substâncias indutoras encontradas na literatura.

Burkert (2003) testou vários indutores (óleo de soja, óleo de milho, óleo de girassol e azeite) para a produção de lipase utilizando o microrganismo *Geotrichum candidum* NRRL- Y552, sendo que os melhores resultados foram obtidos com o óleo de soja.

Os ensaios realizados por Hegedus e Khachatourians (1988) demonstraram que a adição de azeite ao meio YPD induz a produção de lipase por *Beauveria bassiana*.

Hiol *et al.* (1999) verificaram que o óleo de colza era o melhor indutor da produção de lipase por *Rhizopus oryzae*, sendo a actividade máxima obtida no final de 6 dias de incubação.

A presença de azeite no meio de cultura induz a produção de lipase em células de *Aspergillus niger* livres e imobilizadas (Ellaiah, 2004).

Corzo *et al.* (1999) testaram vários indutores de produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*, sendo que os melhores resultados foram obtidos com azeite e óleo de milho.

Por sua vez, Janssen *et al.* (1994) utilizaram uma estirpe de *Bacillus sp.* num meio contendo tripalmitina, tristearina e trimistina, e verificaram que o melhor indutor da actividade lipolítica foi a tripalmitina.

2.5.5 Isolamento e purificação de lipase

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a purificação de lipases microbianas, uma vez que na maioria dos processos de produção obtém-se uma grande variedade de produtos, podendo ser apenas um o desejado.

Assim, a purificação de lipases tem, em geral, dois objectivos básicos, a obtenção da enzima pura, para um melhor estudo das suas características bioquímicas e estrutura e a obtenção de um produto com maior grau de pureza (Koblitz e Pastore, 2004).

Como a maioria das lipases são produzidas extracelularmente, o primeiro passo para a recuperação da enzima consiste na remoção das células do meio fermentativo por centrifugação ou filtração (Rajendran *et al.*, 2009). No entanto, os processos tradicionais de purificação são muito morosos e conduzem a baixos rendimentos. As novas alternativas tecnológicas, como os processos membranares e técnicas cromatográficas, surgem como uma boa alternativa aos processos convencionais (Saxena *et al.*, 2003).

Normalmente os processos de purificação de lipases microbianas extracelulares são constituídos por duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos (Koblitz

e Pastore, 2004). Contudo, os métodos utilizados dependem do microrganismo, dos meios e condições de cultura e das características da enzima produzida.

Na Tabela 2.2 apresentam-se alguns dos métodos descritos na literatura para purificação de lipases.

Tabela 2. 2 - Métodos de purificação de lipases.

Microrganismo	Método de purificação	Referência
<i>P. aeruginosa</i> MB5001	Concentração por ultra-filtração, seguida de cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Chartrain <i>et al.</i> (1993)
<i>P. putida</i> 3SK.	Cromatografia de troca iônica e filtração em gel	Lee e Rhee (1993)
<i>Rhizopus niveus</i> (Lipase I e II)	Homogeneização utilizando uma coluna de cromatografia DEAE-Toyopearl	Kohno <i>et al.</i> (1994)
<i>Proteus vulgaris</i>	Cromatografia de troca iônica	Kim <i>et al.</i> (1996)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP 62 A	Combinação de técnicas de precipitação, cromatografia de afinidade e filtração em gel	Simons <i>et al.</i> (1998)

Assim, as etapas do processo de purificação dependem do produto pretendido, das suas características e do tipo de impurezas presentes, não havendo processos de purificação de aplicação geral.

2.5.6 Métodos de determinação da actividade

A produção microbiana de lipases pode ser detectada em diversos habitats, tais como resíduos industriais, solos contaminados com óleos, vacarias e alimentos em putrefacção, entre outros (Sharma *et al.*, 2001).

Assim, a determinação da actividade lipolítica destas enzimas apresenta-se como um factor essencial para optimização das condições dos processos produtivos.

Como em qualquer reacção enzimática a actividade lipolítica pode ser determinada directa ou indirectamente, ou seja, pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos (Gonçalves, 2007).

De seguida apresentam-se alguns métodos descritos na literatura que permitem determinar a actividade lipolítica.

- **Método das placas de Petri**

Este método de detecção da actividade das lipases foi descrito pela primeira vez por Sierra, em 1957. Neste processo utiliza-se meio com agar e tributirina, onde as colónias de microrganismos produtores de lipase se desenvolvem, e a formação de halos em torno das colónias é um indicador da produção da enzima pelo microrganismo (Sierra, 1957).

- **Método Titulimétrico**

A titulimetria é um dos métodos mais antigos e utilizados para determinar a actividade lipolítica, devido principalmente à sua simplicidade, precisão e reprodutibilidade (Lock, 2007).

A determinação da actividade de lipases por titulimetria baseia-se no método proposto por Stuer *et al.* (1986), onde se titula com NaOH os ácidos gordos libertados pela acção da enzima.

- **Método de hidrólise de *p*-nitrofenil éstres**

Este método espectrofotométrico foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979). Baseia-se na hidrólise de um substrato cromogénico pela enzima, em meio aquoso, o qual após hidrólise resulta na formação de um produto corado, que pode ser quantificado pela leitura da absorvância a um dado comprimento de onda.

- **Fluorescência**

Os compostos fluorescentes também têm sido utilizados para determinar a actividade de lipases. Jette e Ziomeck (1994) descrevem um método de detecção baseado na interacção entre o composto fluorescente Rodamina B e os ácidos gordos libertados durante a hidrólise enzimática dos ácidos gordos. Nesta técnica mede-se a fluorescência dos ácidos gordos libertados pela actividade enzimática, que conduzem à formação de halos fluorescentes rosa-alaranjados em torno ou na própria colónia, e que podem ser visualizados sob luz ultravioleta (Kouker e Jaegar, 1987).

- **HPLC**

Este método é baseado na determinação da inter-esterificação de triglicerídeos por enzimas lipolíticas imobilizadas.

A conversão da tristearina num substrato, a 70 ° C e 200 rpm, é utilizada para quantificar a actividade das enzimas (segundo protocolo Novozymes, Dinamarca).

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS



Neste capítulo serão descritos os métodos, condições e equipamentos utilizados para a realização dos ensaios de determinação da actividade lipolítica, hidrólise do óleo de ricino, produção de lipase e biotransformação.

São ainda apresentados os principais métodos analíticos utilizados.

3.1 Validação do método de determinação da actividade lipolítica

3.2 Hidrólise do óleo de ricino por lipases

3.3 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de *Y. lipolytica*

3.4 Biotransformação

3.5 Métodos analíticos

3.1 Métodos de determinação da actividade de lipase

São vários os métodos descritos na literatura que permitem determinar a actividade lipolítica (Beisson *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi utilizado um método que utiliza um substrato sintético, um *p*-nitrofenil éster, que é hidrolisado por acção enzimática, conduzindo à formação de um produto de coloração amarela, o *p*-nitrofenol, que pode ser monitorizado pela leitura da absorvância a 405 nm.

3.1.1 Validação do método

A etapa de validação do método é feita para garantir que a metodologia analítica é exacta e reprodutível, assegurando uma maior confiança nos resultados obtidos.

Assim, a actividade de lipase foi determinada por dois métodos diferentes de forma a seleccionar qual o método mais adequado.

O método inicialmente utilizado envolvia como substrato o *p*-nitrofenil laurato (Sigma), tendo-se também testado um outro método, entretanto validado (dados não publicados), que utiliza o *p*-nitrofenil butirato (Sigma).

Os métodos analíticos foram analisados ao nível da linearidade, sensibilidade e precisão.

Preparação do substrato 1:

Dissolveu-se 0.018 g de *p*-nitrofenil laurato em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Seguidamente, esta solução foi diluída 100 vezes em tampão fosfato de potássio, 50 mM, pH = 7.

Preparação do substrato 2:

2.63 mM de *p*-nitrofenil butirato em tampão acetato de sódio (pH = 5.6) com 4 % (v/v) de Triton X-100.

Preparação da solução enzimática:

Nos ensaios de validação do método utilizou-se a lipase comercial de *Candida rugosa* (Sigma, L1754). Para os vários ensaios realizados prepararam-se várias soluções com diferentes concentrações de enzima e determinou-se a actividade lipolítica para cada um dos substratos usados.

A actividade ($U \cdot L^{-1}$) da lipase na amostra é determinada através da equação 1:

$$Actividade / \left(\frac{U}{L}\right) = \frac{\Delta Abs}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\epsilon} \cdot \frac{Vt}{Va} \cdot 1000 \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que:

ϵ (mM^{-1}) é o coeficiente de extinção molar do *p*-nitrofenol

Δt é a variação de tempo (min)

ΔAbs é a variação da absorvância

Vt (mL) é o volume reaccional total

Va (mL) é o volume de amostra

Por definição, uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima que é capaz de formar 1 μmol de produto num minuto nas condições do ensaio.

- **Linearidade**

A linearidade do método foi definida pela relação entre a concentração de lipase e a absorvância a 405 nm. Posteriormente, foi calculado o coeficiente de determinação (R^2), que constitui uma medida da proporção da variação da variável independente explicada face à variação da variável dependente.

- **Sensibilidade**

Dos vários ensaios independentes realizados, seleccionou-se aquele cuja regressão linear apresentou um valor de coeficiente de determinação superior. A partir desta recta

determinaram-se os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), recorrendo às equações 2 e 3 (Long e Winefordner, 1983):

$$LD = \frac{3 \times S_{b1}}{b} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{b1}}{b} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

S_{b1} é o erro padrão do termo independente da regressão;

b corresponde ao declive da recta

- **Precisão**

A precisão de um método indica o grau de dispersão obtido numa série de determinações para uma mesma amostra. Desta forma, utilizando uma amostra com uma concentração de 0.004 mg·mL⁻¹ para o substrato *p*-NPL e de 0.04 mg·mL⁻¹ para o *p*-NPB (valores intermédios nas zonas lineares do método), realizaram-se 14 e 10 determinações da actividade lipolítica para cada um dos substratos mencionados anteriormente.

Calculou-se o desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR). Para considerar o DPR aceitável em termos de precisão, recorreu-se ao critério de Horwitz (Horwitz, 1982), segundo o qual o DPR experimental, calculado a partir dos valores experimentais, terá de ser inferior ao DPR teórico, calculado a partir da fórmula de Horwitz (Eq. 4).

$$DPR_{teórico} = 2^{(1-0.5 \times \log C)} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

C é a concentração da amostra, expressa em potência de base 10

3.1.2 Quantificação da actividade lipolítica das diferentes enzimas comerciais

Com base no exposto em 3.1.1, verificou-se que o método inicialmente proposto não era preciso, e como tal adoptou-se em todos os ensaios posteriores de determinação da actividade de lipase, o método que utiliza como substrato a solução de *p*-nitrofenil butirato (Sigma).

- Enzimas em suspensão

Para a determinação da actividade de lipase adicionaram-se 50 µL de solução enzimática a 950 µL de substrato. A reacção ocorreu num banho a 37 °C durante 15 minutos. Ao fim deste tempo adicionaram-se 2 mL de acetona para parar a reacção e de seguida leu-se a absorvância a 405 nm.

- Enzimas encapsuladas

Para a quantificação da actividade lipolítica adicionaram-se diferentes massas de enzima (1.5 – 6 mg) a 15 mL de substrato. A reacção ocorreu num banho a diferentes temperaturas (para a enzima Lipolase foram testadas as temperaturas de 37 °C e 50 °C; para a Lipozyme, as temperaturas de 37 °C e 70 °C), durante 30 minutos. Retiraram-se amostras de 1 mL, de 2 em 2 minutos, adicionaram-se 2 mL de acetona para parar a reacção e de seguida leu-se a absorvância a 405 nm.

Preparação das soluções enzimáticas:

Neste trabalho experimental utilizaram-se diferentes lipases comerciais: lipase de *Candida rugosa* (Sigma, L1754), lipase CALB L® (Novozymes, LCN 02103), Lipozyme TL IM® - encapsulada (Novozymes, LA35009101) e Lipolase ® 100T - encapsulada (Novozymes, RG66AP).

Prepararam-se várias soluções com diferentes concentrações de enzima e determinou-se a actividade de acordo com o método descrito anteriormente.

3.2 Hidrólise do óleo de rícino por lipases

A hidrólise enzimática do óleo de rícino foi quantificada por um método titulimétrico, utilizando hidróxido de potássio (KOH) alcoólico para titular os ácidos gordos libertados.

A mistura reaccional era constituída por 3 % (p/v) de óleo de rícino, 0.3 % (p/v) de Tween 80, 3 mL de tampão fosfato de potássio (pH 6, 7 e 8) 10 mM e 23.2 U da enzima que se pretendia testar. A reacção foi levada a cabo num agitador orbital a 37 °C e 200 rpm, durante 120 horas. Foram retiradas amostras ao longo do tempo, adicionando-se 4 mL de uma mistura acetona/etanol (1:1) para parar a reacção. De seguida, titulou-se a mistura reaccional com KOH alcoólico (0.1 M), usando fenolftaleína como indicador, até ao aparecimento da coloração carmim.

A percentagem de hidrólise é determinada de acordo com a equação 5:

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{M \cdot MM \cdot (V - V_B)}{C_{\text{oleo}} \cdot V_a} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:

M (mol·L⁻¹) é a molaridade do KOH

MM (g·mol⁻¹) é a massa molar do KOH

V (mL) é o volume de KOH gasto na titulação da amostra

V_B (mL) é o volume de KOH gasto na titulação do branco

C_{oleo} (mg·mL⁻¹) é a concentração de óleo na amostra

V_a (mL) é o volume da amostra titulada

I_s é o índice de saponificação do óleo

3.3 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de *Y. lipolytica*

3.3.1 Leveduras

Neste trabalho foram utilizadas as estirpes *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC20460:CLIB89), *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Yarrowia lipolytica* CBS 2073.

3.1.2 Conservação da levedura

A estirpe foi conservada a - 80 °C em tubos criogénicos (Microbank, Pró-Lab Diagnostics). Após descongelação realizou-se uma pré-cultura, durante 48 horas a 27 °C em YPDA (Tabela 3.1). As colónias foram conservadas a 4 °C, servindo posteriormente para inocular os meios de cultura.

Tabela 3. 1– Composição do meio YPDA para manutenção das colónias de *Yarrowia lipolytica*.

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
Extracto de levedura	10
Peptona	20
Glucose	20
Agar	30

A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos.

3.3.3 Meio de crescimento

Na Tabela 3.2 apresenta-se a composição do meio de crescimento. A esterilização do meio foi feita em autoclave, a 121 °C, durante 20 minutos.

Tabela 3. 2– Composição do meio de crescimento de *Yarrowia lipolytica*.

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
Extracto de levedura	10
Peptona	20
Glucose	20

Efectuou-se o crescimento das leveduras em 200 mL de meio contido em matrizes de 500 mL, com anteparos, inoculados com uma concentração celular de 0.5 g·L⁻¹ (correspondente a valores de absorvância a um comprimento de onda de 600 nm (A_{600}) de aproximadamente 0.5). Os matrizes foram mantidos a uma temperatura de 27 °C e agitação constante de 140 rpm, durante 24 horas.

3.3.4 Meios e condições de produção de lipase

Após a fase de crescimento, em meio de glucose, as leveduras foram transferidas para um meio de produção de lipase, contido em matraz. As células foram separadas do meio de crescimento no fim da fase exponencial de crescimento (após 24 horas de cultura) por centrifugação (6000 g, 5 minutos). Em alternativa testou-se a adição directa do meio de produção de lipase ao meio de crescimento, sem efectuar o passo de centrifugação das células.

Na Tabela 3.3 apresenta-se a composição do meio de produção de lipase. O volume foi completado, até ao volume final pretendido, com tampão Tris-HCl 400 mM, a pH 7.2.

Tabela 3. 3 – Composição do meio de produção de lipase (YNB/Azeite) para *Yarrowia lipolytica*.

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
YNB (sem aminoácidos)	6.7
Azeite	7
Goma arábica	5

O meio, sem a adição de YNB, foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Após o arrefecimento, adicionou-se YNB sem aminoácidos dissolvido em tampão do meio de produção, sendo esterilizado por filtração (acrodiscos de 0.2 µm, Orange Scientific).

A produção de enzima foi levada a cabo em matrizes de 500 mL, com anteparos, numa incubadora orbital, a 27 °C, 240 rpm, durante 48 horas.

3.3.4.1 Outros meios de produção

A adição de determinadas substâncias ao meio de cultura pode incrementar a produção de lipase. Assim, testaram-se modificações no meio YNB/Azeite, tendo-se variado o tipo de indutor presente: óleo de rícino (OR) e ricinoleato de metilo (RM), mas mantendo-se a mesma concentração de indutor.

De forma a comprovar que a produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* é incrementada pela adição de substâncias indutoras ao meio de produção, testou-se um novo meio, que continha todos os compostos do meio produção com a excepção do azeite, servindo de controlo.

As condições de produção de lipase são iguais às anteriormente descritas em 3.3.4.

3.4 Biotransformação

Após a fase de produção de biomassa, as estirpes com as quais se obtiveram melhores resultados na secção 3.3 foram utilizadas numa concentração final de 0.5 g·L⁻¹ (correspondente a A₆₀₀ de aproximadamente 0.5) na etapa de biotransformação, realizada em matraz.

3.4.1 Meio de biotransformação

Na Tabela 3.4 é apresentada a composição do meio de biotransformação. O volume é completado, até ao volume final pretendido, com água destilada.

Tabela 3.4 – Composição do meio de biotransformação (MB).

Composto	Concentração (g·L ⁻¹)
Óleo de rícino	30
Tween 80	3
NH ₄ Cl	2.5
YNB (com aminoácidos)	6.7

3.4.2 Outros meios

De forma a concluir qual a influência da adição de lipases extracelulares e de meio com azeite na produção de γ -decalactona, testaram-se três novas estratégias de produção do aroma descritas de seguida.

3.4.2.1 – Adição de lipase extracelular, sem hidrólise prévia do óleo de rícino (Lipase/OR)

Após a fase de produção de biomassa, as leveduras foram transferidas (após centrifugação) para o meio de biotransformação, contido em matraz, adicionando-se também a enzima Lipozyme TL IM, previamente lavada com água estéril.

3.4.2.2 – Adição de lipase extracelular, com hidrólise prévia do óleo de rícino (Lipase/ORH)

Adicionou-se ao meio de biotransformação a enzima Lipozyme TL IM, previamente lavada com água estéril, e incubou-se o matraz a 27 °C e 140 rpm, durante 48 h.

No fim da fase exponencial de crescimento, transferiram-se as células (após centrifugação) para o meio de biotransformação, em matraz, contendo o óleo previamente hidrolisado, de acordo com o procedimento descrito em 3.3.

3.4.2.3 – Adição prévia de meio com azeite ao meio de biotransformação (MB/Azeite)

No fim da fase exponencial de crescimento celular adicionaram-se os componentes do meio de produção de lipase (Tabela 3.3) ao meio de crescimento, de forma a incrementar a produção de enzima pela levedura. Os matrizes foram mantidos num agitador orbital a 27 °C e 240 rpm, durante 24 horas. Após este tempo, adicionaram-se os componentes do meio de biotransformação.

3.4.3 Efeito da velocidade de agitação

Com o intuito de avaliar o efeito da velocidade de agitação na produção de γ -decalactona pela estirpe utilizada, foram efectuadas experiências em matraz a 140 e 240 rpm.

Para todos os ensaios realizados a estas velocidades de agitação, no fim da fase exponencial de crescimento adicionaram-se os componentes do meio de biotransformação ao meio de produção de biomassa.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Concentração celular

3.5.1.1 Número de células

A quantificação da concentração celular foi efectuada por contagem directa ao microscópio óptico, recorrendo a uma câmara de Neubauer (Blaubrand).

3.5.2 Quantificação da γ -decalactona

Durante os ensaios de biotransformação, foram retiradas do meio amostras de 2 mL. Foram adicionados às amostras, 10 μ L de HCl concentrado para promover a lactonização total do ácido 4-hidroxicaproico, possibilitando a quantificação total de γ -decalactona nas amostras.

Foi igualmente adicionado às amostras γ -undecalactona numa concentração de 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, como padrão interno na quantificação da γ -decalactona, que foi extraída do meio de biotransformação por éter dietílico (pureza 99.9 %). Esta extracção líquido/líquido realizou-se adicionando 2 mL de éter dietílico à amostra contida num vial de 4 mL, tendo sido invertido sessenta vezes seguidas, para promover uma mistura eficiente. Após a separação das fases, retirou-se a fase superior com a ajuda de uma pipeta de Pasteur e colocou-se num vial para injeção no cromatógrafo.

O aparelho utilizado foi um cromatógrafo CP 9001, CHROMPACK, com detector FID e uma coluna capilar, modelo TEKNOKROMA TR-WAX (comprimento 30 m, diâmetro interno 0.32 mm e espessura de filme 0.25 μm).

Condições de operação:

Temperatura do injector = 250 °C

Temperatura do detector = 300 °C

Temperatura do forno = programada para aumentar desde 60 °C até 145 °C, numa razão de 5 °C por minuto e depois até 180 °C, numa razão de 2 °C por minuto.

Pressão do gás de arraste (Hélio) = 50 kPa

A quantificação da γ -decalactona produzida foi determinada recorrendo à equação 6.

$$[\gamma - decalactona] = [\gamma - undecalactona] \cdot \frac{1}{K} \cdot \frac{A_{\gamma - decalactona}}{A_{\gamma - undecalactona}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo:

$[\gamma - decalactona]$, a concentração de γ -decalactona em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

$[\gamma - undecalactona]$, a concentração de γ -undecalactona em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

K, o coeficiente de resposta

$A_{\gamma - decalactona}$, a área de γ -decalactona

$A_{\gamma - undecalactona}$, a área de γ -undecalactona

3.5.3 Quantificação da actividade proteásica

A actividade de proteases foi determinada no sobrenadante das amostras. Para tal, recorreu-se à adaptação do método proposto por Pinto (1998).

Para esta determinação adicionaram-se 0.5 mL de amostra a 0.5 mL de substrato e incubou-se durante 40 minutos a 37 °C. Ao fim deste tempo, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10 % (p/v), de forma a precipitar as moléculas proteicas não hidrolisadas pelas enzimas proteolíticas. De seguida, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio ao qual se adicionou 1 mL de KOH 5 N e de seguida leu-se a absorvância a 428 nm, contra um branco. No branco, o substrato foi substituído por tampão acetato 50 mM, pH 5.

Preparação do substrato:

0.5 % (p/v) de azocaseína (Sigma-Aldrich) em tampão acetato 50 mM, pH 5.0.

Uma unidade de actividade é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0.01 de absorvância relativamente ao branco, por minuto, nas condições de reacção.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO



Ao longo deste capítulo serão apresentados os resultados obtidos relativamente à selecção e validação do método experimental utilizado, assim como da determinação da actividade lipolítica das diferentes lipases comerciais testadas.

Apresentam-se ainda os resultados relativos à hidrólise enzimática do óleo de rícino e à produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de *Yarrowia lipolytica*. Por fim, apresentam-se os resultados referentes aos ensaios de biotransformação.

4.1 Validação do método

4.2 Determinação da actividade lipolítica

4.3 Hidrólise do óleo de rícino

4.4 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de *Yarrowia lipolytica*

4.5 Biotransformação

4.1 Validação do método

A validação do método apresenta-se como uma etapa essencial para definir se os métodos utilizados são adequados aos objectivos a que se destinam, a fim de se obterem resultados confiáveis que possam ser satisfatoriamente interpretados. Desta forma é possível conhecer as limitações do método a utilizar, tendo assim uma maior confiança nos resultados obtidos.

Os métodos para determinação da actividade enzimática só são válidos numa determinada gama de concentrações de enzima. Após uma dada concentração, ocorrerá limitação por parte do substrato, verificando-se uma estabilização da reacção. Este comportamento pode ser observado na Figura 4.1.

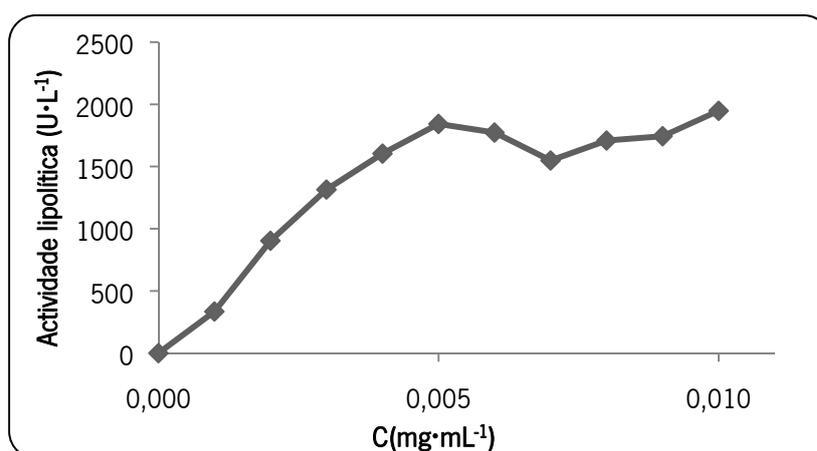


Figura 4. 1- Curva de saturação para a lipase de *C. rugosa* demonstrando a relação entre a concentração de enzima e a actividade enzimática, para o substrato ρ -NPL.

Relativamente à actividade da lipase de *C. rugosa* é possível verificar que esta é directamente proporcional ao aumento da concentração de enzima presente no meio (Figura 4.1). No entanto, como já foi referido, as reacções catalisadas por enzimas são saturáveis e à medida que a quantidade de substrato aumenta, a actividade atinge o seu valor máximo e nestas condições a velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento da concentração de substrato, seguindo uma cinética de Michaelis–Menten (Cabral *et al.*, 2003).

São vários os métodos descritos na literatura que permitem determinar a actividade lipolítica (Beisson *et al.*, 2000). Neste trabalho, a actividade de lipase foi determinada por um método espectrofotométrico, utilizando dois substratos diferentes, o *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL) e o *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB).

Os parâmetros de validação analisados foram a linearidade, sensibilidade e limites de detecção e quantificação.

- **Linearidade**

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada gama de aplicação (Bendicho *et al.*, 2001).

Para determinar a actividade de lipase de *C. rugosa*, fizeram-se vários ensaios com os dois substratos analisados, utilizando diferentes concentrações de enzima (Figura 4.2).

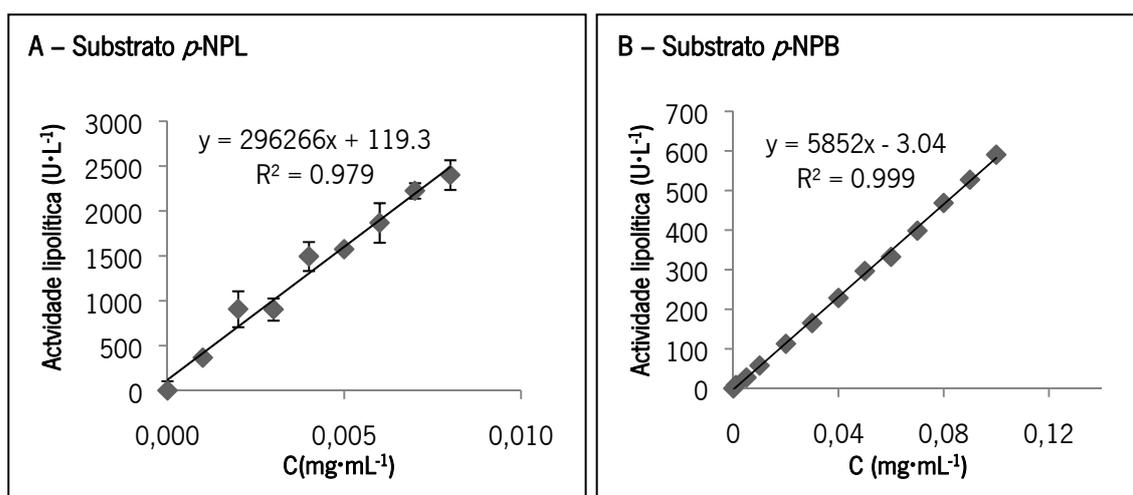


Figura 4. 2– Actividade da lipase de *C. rugosa* para os ensaios realizados, a diferentes concentrações de enzima. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com $n = 3$.

Verificou-se que para a determinação da lipase de *C. rugosa* com *p*-nitrofenil laurato, o método é linear para a gama de concentrações de enzima compreendidas entre 0 e 0.008 mgmL⁻¹ (Figura 4.2 A). Para o substrato *p*-nitrofenil butirato obtêm-se resultados lineares para concentrações de enzima entre 0 e 0.12 mgmL⁻¹ (Figura 4.2 B).

Analisando os valores de coeficiente de determinação (R^2) dos ensaios realizados com os dois substratos, é possível verificar que para o substrato *p*-NPL foi obtido o valor de 0.979 e para

o ρ -NPB 0.999, o que permite concluir que existe uma correlação linear entre a actividade enzimática e a concentração de substrato (Currie *et al.*, 1994). Isso significa que, com pequenas variações na concentração de enzima, obtêm-se grandes variações nos sinais medidos, garantindo-se assim a diferenciação entre duas concentrações bastante próximas.

- **Sensibilidade**

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (Bendicho *et al.*, 2001). Normalmente é definida em termos de limites de detecção e de quantificação (LD e LQ, respectivamente).

Os limites de detecção e quantificação representam a menor concentração da substância em análise que pode ser, respectivamente, detectada e quantificada (Currie, 1999).

Tabela 4. 1- Limites de detecção e de quantificação calculados pelo critério de Long e Winefordner (1983) para avaliar o método de determinação da actividade da lipase de *C. rugosa*.

Amostra	Declive da recta (U·g ⁻¹)	Erro padrão do termo independente	LD (mg·mL ⁻¹)	LQ (mg·mL ⁻¹)
Substrato ρ -NPL	296266	77.8	0.0008	0.0026
Substrato ρ -NPB	5851.997	3.21	0.0016	0.0055

A menor concentração de amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais que foram estabelecidas para este estudo utilizando como substrato o ρ -NPL, é de 0.0008 mg·mL⁻¹ e 0.0016 mg·mL⁻¹, para o ρ -NPB.

Por sua vez, a menor concentração de amostra, que pode ser quantificada na amostra, sob as condições experimentais adoptadas é de 0.0026 mg·mL⁻¹ e 0.0055 mg·mL⁻¹, para os substratos ρ -NPL e ρ -NPB respectivamente.

Os valores de LD e LQ são sensíveis o suficiente para determinar a actividade de lipase nas condições estudadas.

- **Precisão**

A precisão, em validação de métodos, representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra (Bendicho *et al.*, 2001).

A análise em termos de precisão foi efectuada tendo por base o critério de Horwitz (Horwitz, 1982), segundo o qual o DPR experimental terá de ser inferior ao DPR teórico, para que um método seja considerado preciso.

Tabela 4. 2 - Precisão do método de determinação da actividade da lipase de *C. rugosa*.

Amostra	[Amostra] (mg·mL ⁻¹)	Média da actividade lipolítica (U·L ⁻¹)	DP	DPR experimental (%)	DPR teórico
Substrato <i>p</i> -NPL	0.004	1541.1	279.6	18.1	12.9
Substrato <i>p</i> -NPB	0.04	219.1	6.88	3.14	3.25

Como o DPR experimental é superior ao DPR teórico para o substrato *p*-NPL, conclui-se que o método experimental utilizado não é preciso. Por sua vez, quando se utiliza como substrato o *p*-NPB, o DPR teórico é superior ao DPR experimental, o que permite concluir que o método é preciso.

Assim, o método adoptado para a determinação da actividade de lipase em ensaios posteriores utiliza como substrato o *p*-nitrofenil butirato.

4.2 Determinação da actividade lipolítica

As lipases são enzimas que têm como principal função catalisar reacções de hidrólise de triglicéridos insolúveis para gerar ácidos gordos livres, mono e diglicéridos e glicerol. Graças a esta sua função, estas enzimas serão posteriormente utilizadas na hidrólise de óleo de ricino, de modo a ser libertado o seu maior constituinte, o ácido ricinoleico, que será utilizado como substrato na produção de γ -decalactona. Por esta razão, é necessário conhecer-se a actividade das enzimas a utilizar.

Para determinar a actividade específica das diferentes lipases estudadas, procedeu-se como descrito em 3.1.2. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3 - Valores de actividade específica para as diferentes lipases estudadas. São apresentados os valores médios \pm erro padrão para um intervalo com 95 % de confiança.

Enzima	Actividade específica (U \cdot mg ⁻¹ _{enzima})
Lipase de <i>C. rugosa</i>	5.9 \pm 0.7
Lipase CALB L	0.135 \pm 0.008
Lipozyme TL IM	0.23 \pm 0.04
Lipolase 100 T	0.23 \pm 0.09

Analisando a Tabela 4.3, verifica-se que a lipase de *C. rugosa* apresenta valores de actividade específica superiores aos das outras lipases analisadas (5.873 U \cdot mg⁻¹_{enzima}). Além disso, as lipases Lipozyme TL IM e Lipolase 100 T apresentam valores de actividade específica semelhantes. Os menores valores de actividade de lipase são detectados com a enzima CALB L (0.135 U \cdot mg⁻¹_{enzima}).

Tais divergências podem estar relacionadas com o facto de a lipase de *C. rugosa* ser uma enzima comercial e logo o seu grau de pureza é maior, o que conduz a valores de actividade específica superiores. No caso da Lipozyme TL IM e Lipolase® 100 T, estas também são enzimas comerciais mas encontram-se imobilizadas, e como tal não são 100 % puras, pois

uma parte da massa de enzima corresponde à massa do agente imobilizador, o que faz com que a sua actividade seja menor. A lipase CALB L apresenta uma actividade inferior, pois apesar de também ser uma enzima comercial foi utilizada uma solução enzimática a 2 % (v/v) em tampão fosfato de sódio pH 7, o que conduz a uma diluição da enzima e conseqüente valor reduzido de actividade.

De acordo com os dados fornecidos pelos fabricantes, a lipase de *C. rugosa* e a lipase CALB L, possuem actividades específicas de 1170 U·mg⁻¹ e de 600 U·mg⁻¹, respectivamente. Relativamente à Lipolase 100 T e à Lipozyme TL IM, foram fornecidos valores de actividade de 100 U·mg⁻¹ e 250 IUN·g⁻¹, respectivamente.

Comparando os valores de actividade específica obtidos experimentalmente com os fornecidos pelos fabricantes, é possível verificar que estes são bastantes diferentes. Tal diferença deve-se essencialmente ao facto de serem utilizados diferentes métodos analíticos na quantificação da actividade enzimática, uma vez que os valores fornecidos pelo fabricante foram determinados por um método titulimétrico, para o caso da lipase de *C. rugosa*, da lipase CALB L e da Lipolase 100 T e por HPLC, para a Lipozyme TL IM, enquanto que neste estudo foi utilizado um método espectrofotométrico. Por outro lado, a definição de unidade de actividade também é diferente: para a lipase de *C. rugosa*, a unidade é definida como a quantidade de enzima que vai hidrolisar 1 microequivalente de ácido gordo de um triglicerídeo, numa hora, a pH = 7.2 e a 37 °C (segundo protocolo do fornecedor: Sigma-Aldrich, Portugal); para a lipase CALB L, uma unidade define-se como a quantidade de enzima que vai libertar 1 µmol de ácido butírico a partir de tributirina, a pH = 8 e a 50 °C (Orçaire *et al.*, 2006); para a Lipolase 100 T, uma unidade é definida como a quantidade de enzima que é capaz de libertar 1 µmol de ácido butírico, por minuto, a partir da tributirina, a pH = 7 e a 30 °C (segundo protocolo do fornecedor: Novozymes, Dinamarca); para a Lipozyme TL IM, uma unidade corresponde à taxa de conversão de 0.01 g de tristearina por minuto (segundo protocolo do fornecedor: Novozymes, Dinamarca).

Efeito da temperatura na actividade enzimática

Dos vários factores que podem provocar alterações na actividade e estabilidade enzimática, a temperatura pode ser destacada como um dos mais importantes.

Assim, para as duas enzimas imobilizadas estudadas testaram-se duas temperaturas, a temperatura óptima fornecida pelo fabricante e a de 37 °C. Os valores de actividade enzimática obtidos são apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4. 4 – Valores de actividade lipolítica específica para a enzima Lipozyme TL IM, para as temperaturas de 37 °C e 70 °C. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com $n = 3$.

Lipozyme TL IM	T = 37 °C	T = 70 °C
Actividade específica (U·mg ⁻¹ _{enzima})	232.2 \pm 18.1	87.4 \pm 23.2

Tabela 4. 5 – Valores de actividade lipolítica específica para a enzima Lipolase 100 T, para as temperaturas de 37 °C e 55 °C. São apresentados os valores médios \pm erro padrão, com $n = 3$.

Lipolase 100 T	T = 37 °C	T = 55 °C
Actividade específica (U·mg ⁻¹ _{enzima})	233.3 \pm 41.5	141.3 \pm 24.9

Analisando as tabelas anteriores é possível verificar que as duas enzimas apresentam uma actividade específica superior à temperatura de 37 °C. Este resultado contraria os dados fornecidos pelo fabricante, que indicam que a temperatura óptima, ou seja, a temperatura máxima para a qual a enzima possui uma actividade constante por um período de tempo, seria 70 °C para a Lipozyme TL IM e 55 °C para a Lipolase 100 T. No entanto é necessário ter em atenção que os métodos utilizados na determinação da actividade enzimática são diferentes.

O efeito da temperatura na actividade específica da enzima Lipolase 100 T também foi estudado por Fernandez *et al.* (2004) tendo verificado que a maior actividade específica era

obtida para a temperatura de 37 °C (2200 U·mg⁻¹), sendo que os ensaios foram realizados a pH 8, em tampão fosfato 50 mM.

Assim, a termoestabilidade é uma das características mais relevantes para as lipases com potencial aplicação a nível industrial, uma vez que a maioria dos processos emprega temperaturas em torno dos 50 °C. A estabilidade térmica e operacional de muitas lipases, em comparação com a enzima nativa, pode ser significativamente reforçada pela imobilização (Arroyo *et al.*, 1999; Hiol *et al.*, 1999).

4.3 Hidrólise do óleo de rícino

A produção biotecnológica de γ -decalactona utiliza o ácido ricinoleico, que é o principal ácido gordo constituinte do óleo de rícino. A hidrólise do óleo de rícino, por via enzimática, em ácido ricinoleico revela-se uma etapa de grande relevo no processo biotecnológico de produção de γ -decalactona.

De forma a seleccionar as condições para as quais se atinge uma maior percentagem de hidrólise do óleo de rícino, fizeram-se vários ensaios nos quais se variou o tempo de reacção e a composição do meio, assim como o pH e a temperatura, utilizando diferentes lipases comerciais.

Os valores de pH utilizados foram 6, 7 e 8 e as temperaturas 37 °C e 27 °C. Estas condições foram testadas em diferentes composições de meio: 3 % (p/v) de óleo de rícino em tampão fosfato 10 mM, 5 % (p/v) de óleo de rícino em tampão fosfato 10 mM pH 8 e meio de biotransformação com 3 % (p/v) de óleo de rícino.

As reacções decorreram durante 120 horas, utilizando como enzimas a lipase de *C. rugosa*, lipase CALB L, Lipozyme TL IM e Lipolase 100T.

4.3.1- Efeito das condições experimentais na hidrólise do óleo de rícino

A hidrólise enzimática de óleos e gorduras pode ser influenciada por diversos factores externos, tais como a temperatura, pH e concentração de substrato.

Ensaio preliminares demonstraram que com a lipase de *C. rugosa* era obtida uma percentagem de hidrólise muito reduzida, pelo que não se apresentam os resultados relativos a esta enzima.

- Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na hidrólise do óleo de ricino foi analisado utilizando as lipases CALB L, Lipozyme TL IM e Lipolase 100T (Figura 4.3), tendo-se testado as temperaturas de 27 °C e 37 °C.

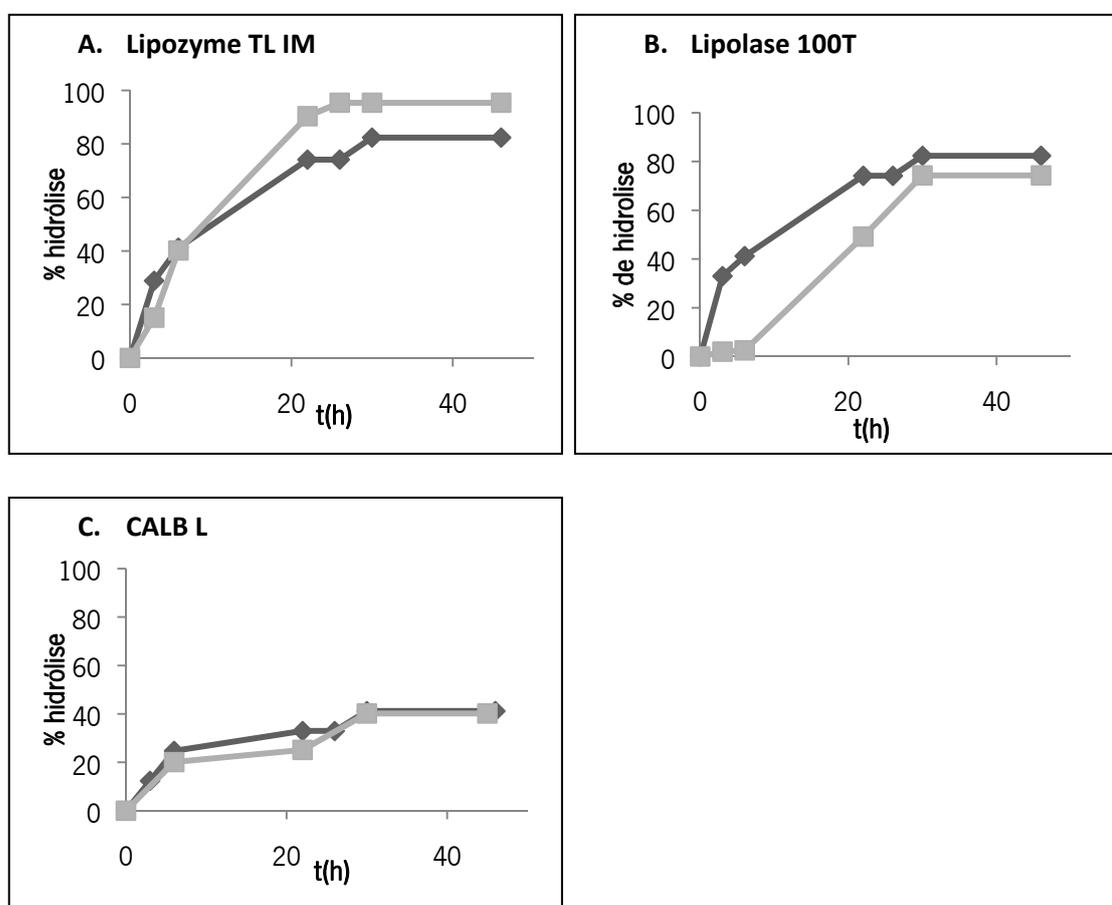


Figura 4. 3 - Efeito da temperatura (37 °C (◆) e 27 °C (■)) na percentagem de hidrólise do óleo de ricino.

A temperatura pode afectar as reacções de hidrólise de uma forma positiva ou negativa. De um modo geral, um aumento da temperatura irá conduzir a um aumento da velocidade da reacção, sendo que um aumento de 10 °C na temperatura do meio pode duplicar ou triplicar a actividade enzimática. Contudo, quando as reacções ocorrem a temperaturas muito elevadas,

pode ocorrer a desnaturação térmica da enzima. Assim, a temperatura afecta a velocidade da reacção sob dois processos independentes: através da actividade da lipase que catalisa a hidrólise e da inactivação térmica da enzima (Leidler e Peterman, 1979).

Analisando a Figura 4.3 é possível verificar que os perfis de hidrólise, para as duas temperaturas analisadas, são muito similares. Para a enzima Lipozyme TL IM (Figura 4.3 A) a maior percentagem de hidrólise (95.37 %) é obtida para a temperatura de 27 °C. No entanto, não se observam diferenças acentuadas nos perfis de hidrólise para as duas temperaturas analisadas, sendo que para 37 °C o grau de hidrólise atingido não é tão elevado.

Na enzima Lipolase 100T (Figura 4.3 B) a maior percentagem de hidrólise (82.3 %) é obtida a 37 °C, às 30 horas. Com a temperatura de 27 °C, embora a degradação do óleo seja inicialmente mais lenta, atinge-se um grau de hidrólise ligeiramente inferior (74.3 %) ao obtido a 37 °C, ao fim do mesmo período de tempo.

A hidrólise do óleo de rícino pela lipase Lipolase 100T também foi estudada por Rathod *et al.* (2009), tendo obtido uma percentagem de hidrólise de 60 % para ensaios realizados à temperatura de 35 °C.

Para a lipase CALB L os perfis de hidrólise para as duas temperaturas são muito semelhantes, obtendo-se a mesma percentagem de hidrólise (41.1 %) a partir das 30 horas.

- Efeito do pH

O pH desempenha um papel importante nas reacções de hidrólise de modo a atingir uma produção óptima de ácidos gordos. A variação de pH afecta a ionização do substrato e das lipases livres (Ory *et al.*, 1962), além do efeito que exerce sobre a actividade lipolítica, uma vez que este actua sobre o complexo lipase-substrato (Tipton e Dixon, 1979).

Assim, o efeito do pH na hidrólise do óleo de rícino foi estudado para os valores de pH 6, 7 e 8, mantendo os outros parâmetros fixos. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.4.

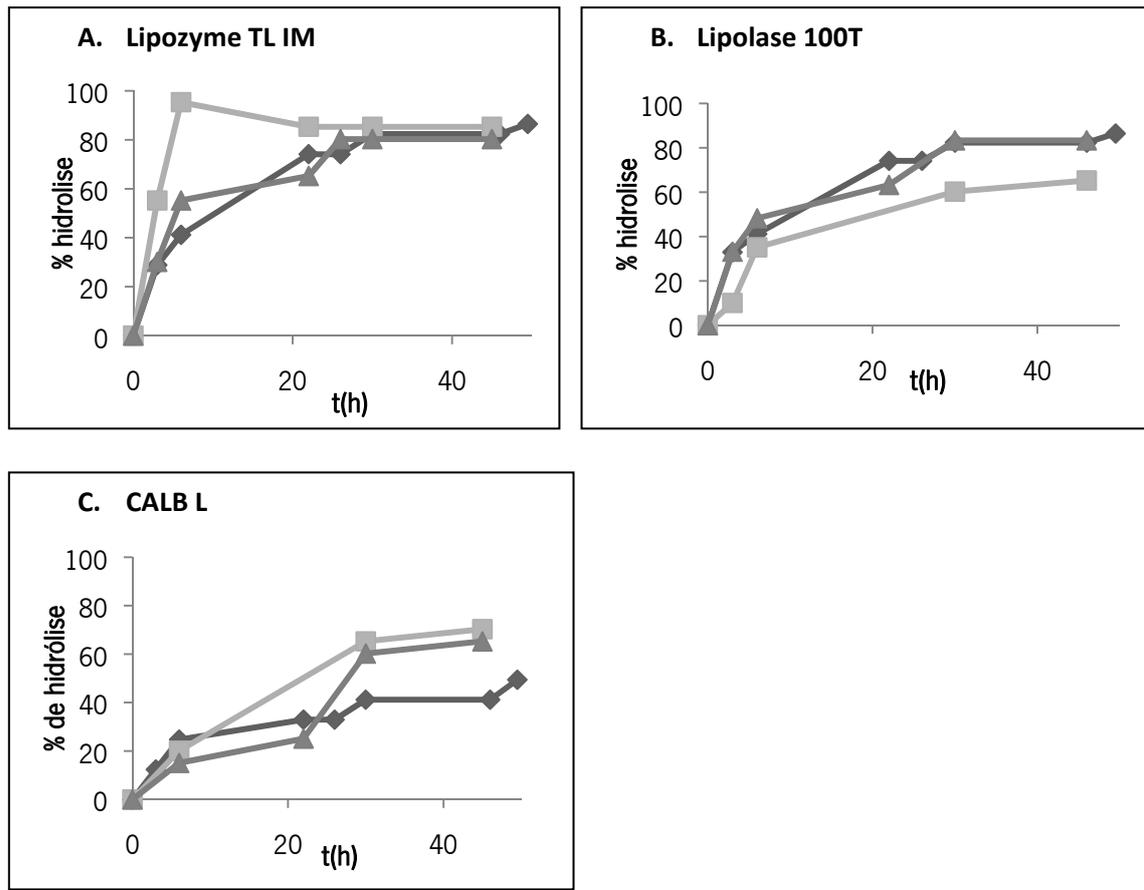


Figura 4. 4- Efeito do pH (pH 6 (■), pH 7 (▲) e pH 8 (◆)) na percentagem de hidrólise do óleo de ricino, para a temperatura de 37 °C.

Pela análise dos resultados é possível verificar que para a Lipozyme TL IM (Figura 4.4 A) o grau de hidrólise (85.3 %) obtido ao fim das 30 horas é igual para os diferentes valores de pH analisados. No entanto, pode-se verificar que para um pH de 6 a reacção é inicialmente mais rápida, obtendo-se uma maior percentagem de hidrólise num menor período de tempo (6 horas).

Para a Lipolase 100T (Figura 4.4 B), a hidrólise a valores de pH de 7 e de 8 é muito semelhante, obtendo-se o mesmo grau de hidrólise (83.3 %) ao fim de 30 horas. A pH mais ácido (pH 6) obteve-se uma menor percentagem de hidrólise (65.25 %).

No caso da lipase CALB L, a reacção ocorre a uma velocidade mais elevada nas primeiras horas, para pH 6, no entanto, ao fim de 48 horas atinge-se o mesmo grau de hidrólise (65 %) que a pH 7. A pH 8 atingem-se graus de hidrólise reduzidos (53 %) quando comparados com os anteriores.

- Efeito da concentração de substrato

A cinética da reacção de hidrólise do óleo pelas lipases é fortemente afectada pela concentração de substrato. Assim, testaram-se duas concentrações de substrato, 3 % (p/v) e 5 % (p/v), mantendo os restantes parâmetros fixos, temperatura 37 °C e pH 8 (Figura 4.5).

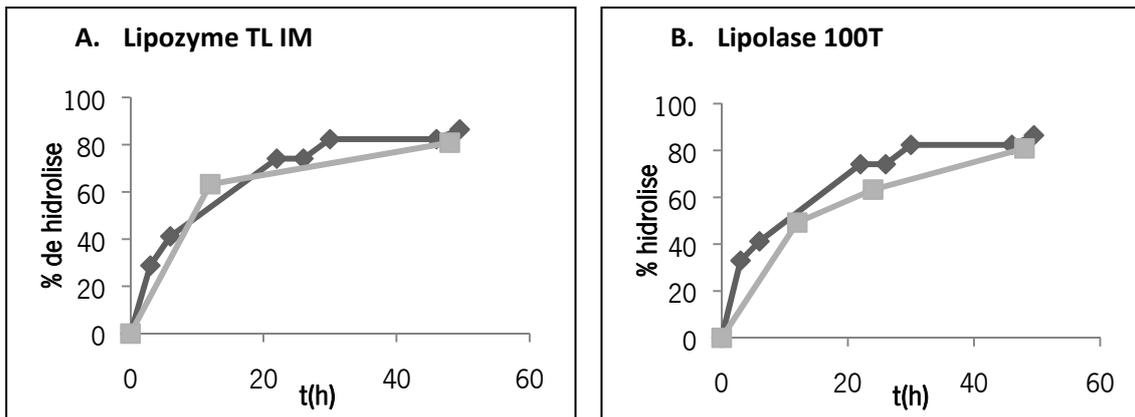


Figura 4. 5 - Efeito da concentração de substrato (3 % (p/v) (◆) e 5 % (p/v) (■)) na percentagem de hidrólise do óleo de rícino.

Conforme se pode observar na Figura 4.5, os perfis de hidrólise das duas enzimas analisadas são semelhantes para as duas concentrações de substrato testadas, sendo que a velocidade é inicialmente crescente com o aumento do tempo de reacção e depois torna-se constante, uma vez que foi atingida a hidrólise máxima. Como a velocidade da reacção depende do número de moléculas de enzimas ligadas a moléculas de substrato, quando o número de moléculas de substrato é baixo, a probabilidade de colisão entre moléculas de enzimas e de substrato é pequena. Assim, quando se aumenta a concentração de substrato, aumentam os “encontros” entre enzimas e substratos, aumentando a velocidade da reacção. No momento em que a enzima se encontra saturada com o substrato, mesmo que se aumente a quantidade de substrato presente no meio, a velocidade da reacção não irá aumentar, como se verificou neste caso, em que o aumento da concentração de óleo no meio não conduziu a valores de percentagem de hidrólise superiores. Desta forma, não se verificou qualquer vantagem com o incremento da quantidade de óleo de rícino no meio.

A título de resumo apresentam-se na Tabela 4.6 as percentagens máximas obtidas para as diferentes condições experimentais testadas (pH, T e concentração de óleo de ricino).

Tabela 4. 6 - Percentagem de hidrólise do óleo de ricino para as diferentes condições analisadas (pH, T e concentração de substrato).

Condições	Tempo de hidrólise máxima (h)	Hidrólise máxima (%)			
		Lipozyme TL IM	Lipolase 100T	Lipase CALB L	Lipase de <i>C. rugosa</i>
pH 8 37 °C 5 % (p/v) OR	48	80.9	80.9	—	—
pH 8 37 °C 3 % (p/v) OR	54	94.7	90.6	53.5	32.9
pH 8 27 °C 3 % (p/v) OR	30	95.4	74.3	40	—
pH 7 37 °C 3 % (p/v) OR	30	80.3	83.3	65	—
pH 6 37 °C 3 % (p/v) OR	30	85.3	65.3	65	—
MB 37 °C 3 % (p/v) OR	48	89.5	—	—	—

Analisando a Tabela 4.6 é possível verificar que todas as lipases testadas foram capazes de hidrolisar o óleo de ricino, sendo que a maior percentagem de hidrólise (95.4 %) foi obtida

quando se utilizou a enzima Lipozyme TL IM, a pH 8, 27 °C, com uma concentração de óleo de rícino de 3 % (p/v), ao fim de 30 horas.

Para a Lipolase 100T o maior grau de hidrólise (90.6 %) foi atingido a pH 8 e 37 °C, ao fim de 54 horas; já para a lipase CALB L uma hidrólise de 65.0 % foi atingida ao fim de 30 horas, a 37 °C e para valores de pH de 6 e 7. Com a lipase de *C. rugosa* foi obtida uma percentagem de hidrólise muito reduzida (32.9 %), a pH 8 e 37 °C, ao fim de 54 horas, pelo que não foram realizados mais ensaios com esta enzima.

É ainda possível verificar que as maiores percentagens de hidrólise são obtidas quando se utilizam enzimas imobilizadas. Estas diferenças podem estar relacionadas com as diferentes estruturas tridimensionais dos sítios activos das lipases utilizadas (Gutierrez-Ayesta *et al.*, 2007) ou também pela possível hiperactivação ocasionada pelo método de imobilização usado na produção da enzima que deixaria o sítio activo sempre exposto e activo (Cunha, 2007).

A utilização da lipase CALB L em reacções de hidrólise de óleos vegetais não é muito comum, sendo que esta enzima é mais utilizada na resolução de misturas racémicas (Guieysse *et al.*, 2004; Ong *et al.*, 2006), na síntese de novas moléculas (Fantin *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2006) ou noutras modificações de óleos e gorduras (Hérendez-Martín e Otero, 2008). Assim, a obtenção de baixos rendimentos em ácidos gordos com esta lipase vem reforçar este facto.

Contudo, os resultados obtidos com a lipase de *C. rugosa* contrariam alguns dos resultados encontrados na literatura, que referem elevadas percentagens de hidrólise ao utilizar esta lipase. Linfield *et al.* (1984) referem que com a lipase de *C. rugosa* é possível obter uma hidrólise de 95 % a 98 % em 72 horas. Por sua vez, Khor *et al.* (1986) reportam uma hidrólise completa do óleo de palma em 5 horas, utilizando a mesma lipase. Kamarudin *et al.* (2008) utilizaram uma lipase de *C. rugosa* na hidrólise de óleo de palma tendo verificado que a conversão máxima (97.2 %) era obtida ao fim de 90 minutos, com uma concentração de óleo de 0.1 g.mL⁻¹, a 45 °C e pH 7.5. Tais diferenças podem estar relacionadas com o facto de não serem utilizadas as mesmas condições experimentais, tais como o tipo e concentração de substrato, pH do meio, temperatura, entre outros.

Através da análise dos resultados anteriores foi possível verificar que as maiores percentagens de hidrólise foram obtidas com a lipase Lipozyme TL IM. Por esta razão, esta lipase foi seleccionada para hidrolisar o óleo de rícino usado como precursor na produção de γ -decalactona, uma vez que, para além de conduzir à obtenção de elevadas percentagem de

hidrólise do óleo de rícino, também demonstrou ser uma enzima bastante estável relativamente às variações ambientais, nomeadamente pH e temperatura.

4.4 Produção de extractos de lipase por diferentes estirpes de *Yarrowia lipolytica*

4.4.1- Comparação de meios e estratégias de arranque na produção de lipase

A levedura *Yarrowia lipolytica* tem sido indicada como um dos microrganismos com maior potencial para a produção de lipase, sendo que a optimização das condições de cultura pode conduzir a um incremento na produção de lipase. Factores como a temperatura, pH e composição do meio podem afectar a produção de lipases extracelulares. Contudo, a presença de alguns compostos, tais como ácidos gordos, triglicéridos e surfactantes, pode induzir a secreção de lipase (Corzo e Revah, 1999; Dalmau *et al.*, 2000).

Assim, será induzida a produção de lipases por esta levedura e em seguida estas enzimas serão utilizadas na hidrólise do óleo de rícino, de modo a libertar o ácido ricinoleico, que será utilizado como substrato para a produção de γ -decalactona.

Foram testadas três estirpes da levedura *Yarrowia lipolytica* (*Yarrowia lipolytica* W29, *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Yarrowia lipolytica* CBS2073) com o intuito de avaliar quais as condições e a estirpe com as quais se obtém uma maior produção de lipase.

Na produção de lipase pelas três estirpes foram testados dois meios de cultura, meio YNB/Azeite e YNB/B, com o intuito de avaliar a necessidade da adição de um indutor para a produção de lipase.

Além disso, foram utilizadas duas metodologias para a inoculação do meio de produção de lipase, que incluía ou não o passo de centrifugação das células.

Na Tabela 4.7 apresentam-se os valores de actividades lipolítica e de protease extracelular, para as três estirpes de *Y. lipolytica*, assim como o tempo para o qual foi obtida a produção máxima de lipase, para as diferentes condições analisadas.

Tabela 4. 7 - Valores de actividades máximas de lipase e protease extracelular, para as estirpes de *Y. lipolytica* W29, IMUFRJ 50862 e CBS 2073.

Estirpe	Condições	Tempo (h)	Actividade lipolítica extracelular (U·L ⁻¹)	Tempo (h)	Actividade proteolítica extracelular (U·L ⁻¹)
<i>Y. lipolytica</i> W29	Células centrifugadas (YNB/Azeite)	30	448.62	30	3402.5
	Células não centrifugadas (YNB/Azeite)	26	515.8	30	2317.5
	Células centrifugadas (YNB/B)	—	0	28	1197.5
	Células não centrifugadas (YNB/B)	30	237.97	47.5	5215
<i>Y. lipolytica</i> IMUFRJ 50862	Células centrifugadas (YNB/Azeite)	22	117.6	24	1507
	Células não centrifugadas (YNB/Azeite)	45.5	172.3	30	565.0
	Células centrifugadas (YNB/B)	22	95.6	24	222.5
	Células não centrifugadas (YNB/B)	45.5	278.9	45.5	867.5
<i>Y. lipolytica</i> CBS 2073	Células centrifugadas (YNB/Azeite)	22	415.22	20	1905
	Células não centrifugadas (YNB/Azeite)	45.5	397.7	20	107.5
	Células centrifugadas (YNB/B)	22	142	26	832.5
	Células não centrifugadas (YNB/B)	26	378	45.5	1935

Através da análise da Tabela 4.7 é possível verificar que, para as estirpes *Y. lipolytica* W29 e *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862, se obtém uma maior produção de lipase, para os dois meios

testados, quando não se efectua o passo prévio de centrifugação. No caso da estirpe *Y. lipolytica* CBS 2073, este aumento da produção de lipase só se verifica para o meio YNB/B.

O aumento da produção de lipase no meio em que não se efectua o passo prévio de centrifugação pode estar relacionado com a presença da lipase que foi produzida na etapa de crescimento, induzida pela presença de glucose no meio, uma vez que alguns autores referem que a glucose é um bom indutor para a produção de lipase por diferentes microrganismos, incluindo estirpes de *Yarrowia lipolytica*: *Y. lipolytica* CECT 1240 (Domínguez *et al.*, 2003), *Y. lipolytica* CBS 6303 (Destain *et al.*, 1997) e *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 (Kawasse *et al.*, 2003). Quando se efectua o passo de centrifugação das células, a lipase que estava aderida às membranas pode ser parcial ou totalmente removida, o que conduz a valores de actividade de lipase inferiores. Além disso, neste último caso também é necessário que as células se adaptem ao novo meio, o que pode conduzir a valores de actividade lipolítica inferiores.

Na Tabela 4.8 apresentam-se os valores de actividades totais de lipase e protease, para a estirpe *Y. lipolytica* W29.

Tabela 4. 8- Valores de actividades totais máximas de lipase e protease, para a estirpe *Y. lipolytica* W29.

Estirpe	Condições	Tempo (h)	Actividade lipolítica total (U·L ⁻¹)	Tempo (h)	Actividade proteolítica total (U·L ⁻¹)
<i>Y. lipolytica</i> W29	Células centrifugadas (YNB/Azeite)	22	1007.3	24	2785
	Células não centrifugadas (YNB/Azeite)	24	1008.9	45.5	2475
	Células centrifugadas (YNB/B)	24	811.5	26	1157.5
	Células não centrifugadas (YNB/B)	45.5	888.1	45.5	3505

Analisando os dados presentes na Tabela 4.8 é possível verificar que os valores de actividade lipolítica total obtida com a estirpe *Y. lipolytica* W29 são superiores aos de actividade extracelular (Tabela 4.7), para todos os ensaios realizados. Este resultado era previsível uma vez

que na determinação da actividade lipolítica total se quantifica a lipase aderida às células e a lipase extracelular. Assim, como os ensaios de determinação de actividade lipolítica total são realizados na presença de células, seria de esperar que aquele valor fosse superior ao da actividade extracelular, que quantifica apenas a enzima excretada para o meio de cultura.

A produção de lipase pode ser induzida pela adição de vários substratos triglicéridos ao meio. Analisando o efeito da adição de azeite ao meio de produção, pode-se verificar que houve um aumento da produção de lipase para as três estirpes estudadas quando se adicionou azeite ao meio. Na ausência de azeite, as actividades lipolíticas extracelulares máximas foram de: 0.0 U·L⁻¹, 95.6 U·L⁻¹ e 142.0 U·L⁻¹ para as estirpes *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS 2073, respectivamente. Já quando se adicionou azeite, as actividades foram de: 448.6 U·L⁻¹, 117.6 U·L⁻¹ e 415.2 U·L⁻¹, para as estirpes *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS 2073, respectivamente. Estes resultados são concordantes com os estudos levados a cabo por Domínguez *et al.* (2003) que referem um aumento da produção de lipase extracelular pela levedura *Y. lipolytica* CECT 1240 quando se adicionam substratos lipídicos, como o azeite, ao meio de cultura.

Quando se utiliza o meio YNB/B com células não centrifugadas observa-se um incremento da produção de lipase pelas três estirpes estudadas, o que pode estar relacionado com a presença de uma fonte carbono no meio que induz a produção de lipase. Para o meio YNB/B, as actividades lipolíticas extracelulares máximas foram de: 238 U·L⁻¹, 278.9 U·L⁻¹ e 378 U·L⁻¹ para as estirpes *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS 2073, respectivamente.

A adição de azeite ao meio de crescimento, sem centrifugar as células, também provoca um incremento na produção de lipase para as condições analisadas, comparativamente aos ensaios em que se centrifugaram as células e se ressuspenderam no meio com azeite. Assim, quando se adicionou azeite ao meio de crescimento obtiveram-se os valores máximos de actividade extracelular de 515.8 U·L⁻¹ para a estirpe *Y. lipolytica* W29, 172.3 U·L⁻¹ para a estirpe *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e 397.7 U·L⁻¹ para a estirpe *Y. lipolytica* CBS 2073. Contudo, nos ensaios em que se utilizaram células centrifugadas, na presença de azeite, obtiveram-se valores máximos de actividade de 448.62 U·L⁻¹, 117.6 U·L⁻¹ e 415.22 U·L⁻¹, para as estirpes *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS 2073, respectivamente. Hegedus e Khachatourians (1988) analisaram o efeito da adição de 2 % (p/v) de azeite ao meio YPD e a um meio com glucose e sais (meio GS), tendo verificado que em ambos os meios houve um

aumento da produção de lipase, obtendo-se valores de actividade de $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, na ausência de azeite, $300 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ quando se adicionou azeite ao meio YPD e $150 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, quando se adicionou azeite ao meio GS.

Relativamente à presença de indutores, conclui-se que para a estirpe *Y. lipolytica* W29 é necessário adicionar ao meio um indutor para haver produção de lipase, uma vez que quando não estão presentes no meio azeite ou uma fonte de carbono, não é detectada qualquer actividade lipolítica (Tabela 4.8, células centrifugadas YNB/B).

Contudo, quando se quantifica a lipase total, é detectada actividade mesmo na ausência de qualquer indutor ($8115 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$). Tal facto pode ser justificado pela presença de células no meio, que tenham alguma lipase aderida às suas paredes.

Assim, as condições com as quais se obtém uma maior actividade de lipase, para a estirpe *Y. lipolytica* W29 envolvem a utilização de azeite e uma fonte de carbono ($515.8 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ e $1008.9 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, lipase extracelular e total, respectivamente). Contudo, para a estirpe *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 a maior actividade de lipase é obtida na presença de uma fonte de carbono ($278.9 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$) e para a *Y. lipolytica* CBS 2073, é a adição de azeite ao meio que induz uma maior actividade de lipase ($415.2 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$).

Analisando os valores de actividade total e extracelular de protease, é possível verificar que, para a maioria dos ensaios realizados, o pico da actividade das proteases ocorre após se ter atingido o máximo da actividade lipolítica. Este ponto será melhor discutido no sub-capítulo seguinte, após análise da actividade das proteases existentes no meio. Assim, é possível que a inibição da actividade da lipase, após um certo tempo, esteja relacionada com a degradação da lipase por acção das proteases.

A adição de inibidores de protease ao meio de cultura durante a produção da lipase seria uma forma de evitar a degradação da enzima e aumentar a quantidade de lipase produzida.

Pela análise dos resultados anteriores foi possível concluir que os maiores valores de actividade lipolítica extracelular foram obtidos com a estirpe *Y. lipolytica* W29. Assim, esta foi a estirpe seleccionada para os ensaios posteriores de produção de lipase e será a única estirpe utilizada nos ensaios de biotransformação.

4.4.2- Influência de diferentes indutores na produção de lipase

Os mecanismos que regulam a produção de lipase variam de microrganismo para microrganismo. Resultados obtidos com *Rhizopus* (Salleh *et al.*, 1993), *Aspergillus* (Pokorny *et al.*, 1994) e *Rhodotorula* (Papaparaskevas *et al.*, 1992) demonstram que a produção de lipase é independente da adição de substratos lipídicos ao meio de cultura, contudo a sua presença incrementa a produção de lipase. Por outro lado, microrganismos como *G. candidum* (Shimada *et al.*, 1992) necessitam da adição de um substrato lipídico para a produção de lipase.

Assim, de modo a analisar a influência do tipo de indutor para a produção de lipase por *Y. lipolytica* W29, realizaram-se vários ensaios com diferentes tipos de indutores (azeite, óleo de rícino e ricinoleato de metilo), sendo que as células foram separadas do meio de crescimento de biomassa por centrifugação.

Na Figura 4.6 apresentam-se os valores de actividade lipolítica (extracelular e total) ao longo do tempo, para os vários ensaios realizados com a levedura *Y. lipolytica* W29.

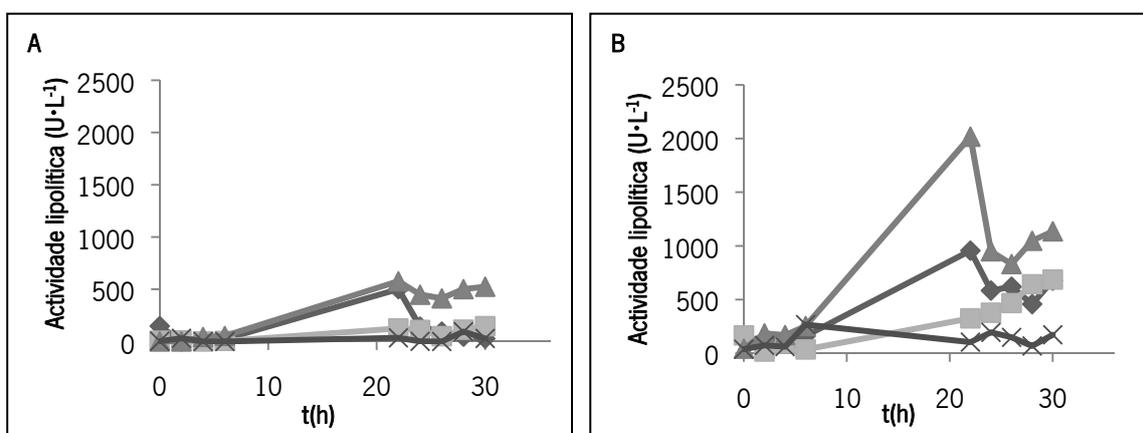


Figura 4. 6 – Cinética de produção de lipase durante a cultura de *Y. lipolytica* W29 em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×): (A) actividade lipolítica extracelular; (B) actividade lipolítica total.

Pela análise da figura anterior é possível verificar que o comportamento da actividade da lipase, extracelular e total, para os vários ensaios realizados, descreve um aumento da actividade lipolítica ao longo do tempo, atingindo-se o pico de produção de lipase para o mesmo tempo. Para ambos os casos, após 22 horas observa-se uma queda na produção de lipase, para os

meios YNB/RM e YNB/Azeite. No caso dos meios YNB/OR e YNB/B a produção de lipase começa a diminuir a partir das 30 e 28 horas, respectivamente.

Trabalhos realizados por Lopes (2007) e Amaral (2007) utilizando a levedura *Y. lipolytica* para a produção de lipase, obtiveram o máximo de produção lipase às 22 horas de cultura. No entanto, estudos de produção de lipase extracelular por *Y. lipolytica* CECT 1240, realizados em matraz, efectuados por Domínguez *et al.* (2003), demonstraram que o valor de actividade lipolítica máximo era obtido ao oitavo dia de produção.

Comparando a evolução da produção de lipase, para os vários indutores testados, pode-se verificar que a quantidade de lipase obtida depende da natureza e estrutura do substrato lipídico utilizado. Assim, a maior produção de lipase é obtida quando se utiliza o meio YNB/RM (576.9 U·L⁻¹ e 2017.6 U·L⁻¹, lipase extracelular e total, respectivamente), seguida de YNB/Azeite (501 U·L⁻¹ e 956.4 U·L⁻¹) e YNB/OR (126.01 U·L⁻¹ e 325.65 U·L⁻¹). Contudo, é ainda possível observar que na ausência de qualquer indutor (YNB/B) esta estirpe produz quantidades muito reduzidas de lipase.

A elevada produção de lipase obtida quando se utiliza ricinoleato de metilo como indutor está relacionada com a estrutura química do substrato, que permite uma maior biodisponibilidade do substrato.

Segundo Iwai *et al.* (1984), a quantidade de ácido oleico presente no meio influencia significativamente a produção de lipase. Assim, a incorporação de azeite no meio de produção também provoca um incremento na produção de lipase, uma vez que o triglicerídeo mais abundante no azeite é o ácido oleico (28 %). Hegedus e Khachatourians (1988) comprovaram que a produção de lipase podia ser induzida pela adição de vários substratos triglicerídeos ao meio, tendo verificado que a maior actividade de lipase (900 U·mL⁻¹) era obtida quando se adicionava 5 % (p/v) de azeite ao meio, ao fim de 5 dias de cultura. Corzo e Revah (1999) testaram vários indutores (tais como azeite, óleo de ricino, óleo de coco, ácido oleico, entre outros) para a produção de lipase por *Y. lipolytica* 681 tendo verificado que o azeite era o melhor indutor (14.7 U·mL⁻¹).

A incorporação de óleo de ricino no meio conduziu a uma produção de lipase muito reduzida (1.6 U·mL⁻¹). Os baixos níveis de actividade lipolítica detectada na presença deste óleo podem estar relacionados com o seu baixo conteúdo em ácidos gordos insaturados, uma vez que a indução da produção de lipase é apenas influenciada pelo número de insaturações presentes (Lima *et al.*, 2003).

Assim, todos os compostos lipídicos testados neste trabalho induzem a produção de lipase relativamente à cultura controlo, sendo que o melhor indutor para a produção de lipase, nas condições analisadas, é o ricinoleato de metilo.

Comparando os valores de actividade lipolítica extracelular e total, pode-se verificar que a quantidade de lipase total produzida é superior à extracelular, para todos os ensaios realizados. Este resultado era previsível, pelas razões previamente explicadas no sub-capítulo 4.4.1.

A actividade lipolítica detectada no meio de cultura (extracelular) é o resultado do balanço entre a actividade da lipase produzida e da degradada por acção das enzimas proteolíticas produzidas pelo microrganismo no decorrer do processo (Pereira-Meireles *et al.*, 1997; Martins, 2001). Assim, as amostras recolhidas no decorrer da fermentação foram analisadas quanto à presença de proteases no meio, de acordo com o descrito em 3.5.3. Os perfis da actividade proteolítica (extracelular e total), produzida por *Y. lipolytica* W29 nos vários ensaios são apresentados na Figura 4.7.

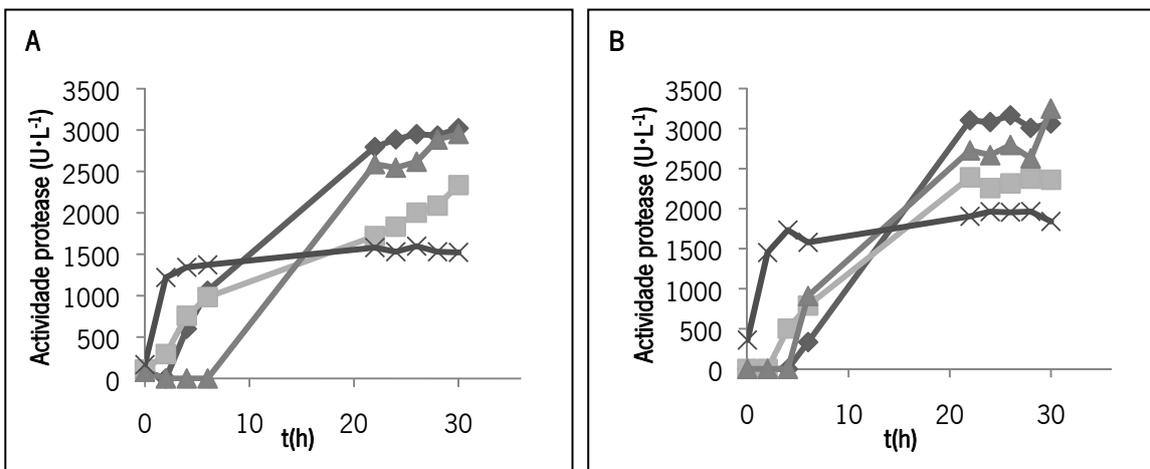


Figura 4. 7 - Cinética da actividade de protease de *Y. lipolytica* W29 em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×): (A) actividade extracelular de protease; (B) actividade total de protease.

Analisando a Figura 4.7 é possível verificar que, em todos os ensaios, durante as primeiras horas de cultura, a actividade das proteases é reduzida, aumentando gradualmente até ao final da cultura.

A produção de proteases é superior para os ensaios realizados com YNB/Azeite e YNB/RM, enquanto que para os ensaios com YNB/OR e YNB/B a sua concentração no meio é relativamente inferior.

Para todos os ensaios realizados, o valor máximo da actividade das proteases foi obtido após se ter atingido o máximo da actividade da lipase, como já foi referido anteriormente.

Comparando a produção de protease extracelular com a total, pode-se verificar que os resultados obtidos são muito semelhantes, uma vez que estas enzimas são excretadas pela célula para o meio de cultura, não ficando aderidas à parede celular. Assim, a quantidade de protease produzida não é influenciada pela presença de células no meio.

Com o intuito de avaliar a influência dos vários indutores no crescimento celular, determinaram-se os perfis de crescimento da levedura *Y. lipolytica* W29 para cada um dos meios estudados (Figura 4.8).

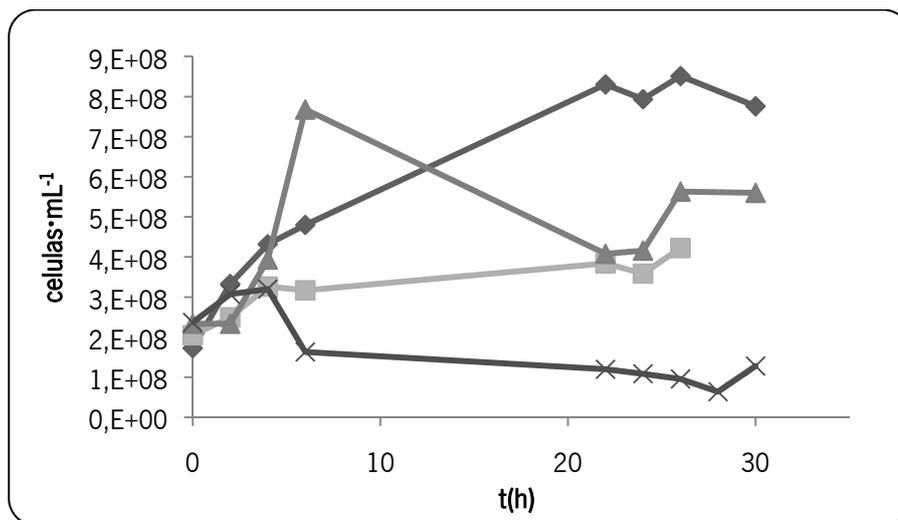


Figura 4. 8 – Evolução do crescimento celular de *Y. lipolytica* W29 ao longo do tempo em YNB/Azeite (◆), YNB/OR (■), YNB/RM (▲) e YNB/B (×).

Através da análise da Figura 4.8 é possível verificar que as condições com as quais se obtém um maior crescimento celular são com o meio YNB/Azeite e YNB/RM, apesar de o crescimento máximo ser obtido para tempos diferentes.

A utilização do meio YNB/OR conduz a um crescimento celular inferior, mas com o meio YNB/B o crescimento celular diminui drasticamente, o que pode estar relacionado com a

ausência dos componentes do meio de produção de biomassa que sustentam o crescimento celular.

As diferenças observadas para os diferentes meios estão relacionadas com o tipo de fonte de carbono presente no meio, sendo que uns substratos são mais facilmente metabolizáveis pela levedura que outros. No entanto, é importante salientar que o método utilizado para determinar a concentração celular tem um erro associado muito elevado.

4.5 Biotransformação

4.5.1- Efeito da composição do meio na produção de γ -decalactona

A produção de aroma pela levedura foi investigada na presença de diferentes composições de meio. A adição de lipase e de um indutor da produção de lipase (azeite) ao meio de cultura foi testada com o intuito de avaliar o seu efeito na produção de γ -decalactona. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.9.

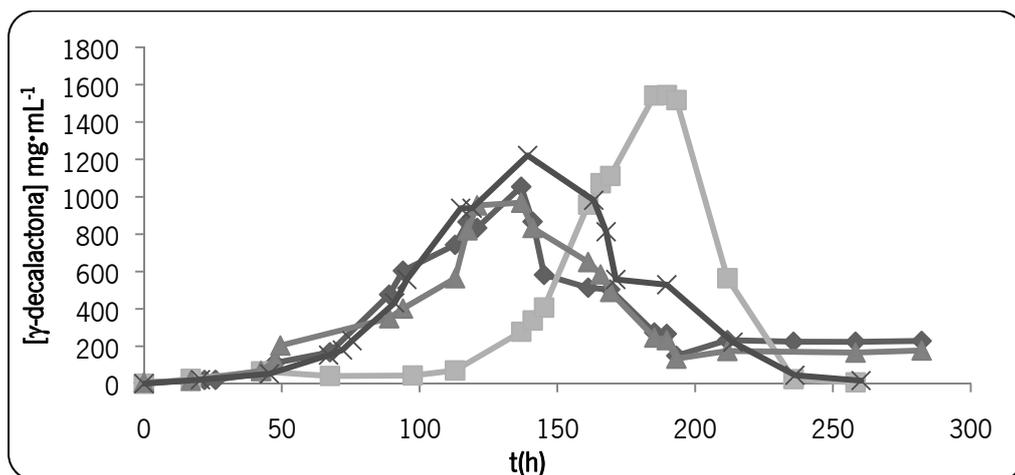


Figura 4. 9 - Produção de γ -decalactona a 140 rpm, para diferentes composições do meio de biotransformação: Lipase/OR (◆), MB (■), Lipase/ORH (▲) e MB/Azeite (×).

Conforme se pode observar na Figura 4.9, para todos os ensaios realizados, a concentração de γ -decalactona aumenta até se atingir o valor máximo, sendo que após esse tempo, se observa uma diminuição na produção do aroma, até este desaparecer totalmente. Este decréscimo na produção de γ -decalactona deve-se ao facto deste metabolito ser consumido pela levedura como fonte de carbono (Aguedo, 2002).

Para os ensaios em que se adicionou lipase extracelular (Lipase/OR e Lipase/ORH) e indutor da produção de lipase (MB/Azeite), a produção de γ -decalactona começa a ser detectada a partir das 60 horas de fermentação, tendo-se obtido a produção máxima às 140 horas de cultura. No caso em que se utiliza apenas óleo de rícino (MB) a produção de aroma começa a ser detectada mais tardiamente, por volta das 120 horas, obtendo-se a produção máxima às 185 horas.

A existência de uma fase lag na produção de γ -decalactona pode ser atribuída ao período de tempo necessário para a síntese das lipases que intervêm na hidrólise do óleo de rícino, de forma a tornar disponível o ácido ricinoleico para a síntese do aroma. A adição de óleo de rícino hidrolisado, enzimas extracelulares ou indutores de lipase diminuem o período de latência da produção do aroma, uma vez que nestas condições o óleo de rícino é mais facilmente hidrolisado em ácido ricinoleico, precursor da γ -decalactona. Quando está presente no meio apenas óleo de rícino (MB) é necessário que a enzima produza a lipase necessária para hidrolisar o óleo, retardando assim o aparecimento do aroma.

Se se comparar a produção máxima deste composto nos vários ensaios apresentados, verifica-se que para o meio MB obteve-se uma produção máxima de $1600 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para o meio MB/Azeite $1200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para os meios Lipase/OR e Lipase/ORH a concentração máxima de aroma detectada foi $1000 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Apesar de a produção de aroma para MB ser mais tardia, obtém-se uma maior quantidade de γ -decalactona nestas condições.

As menores concentrações de aroma detectadas nos meios em que se adicionaram lipases extracelulares e indutores de lipase pode estar relacionada com o facto de nessas condições se observar uma maior libertação de ácidos gordos, que podem exercer um efeito tóxico na levedura, levando a uma menor produção de γ -decalactona (Waché *et al.*, 2001).

Pagot *et al.* (1997) sugerem que a baixa produção de γ -decalactona, em alguns casos, deve-se ao facto de o ácido ricinoleico ser a única fonte de carbono presente em alguns meios de biotransformação, sendo que uma parte deste ácido é usada para a manutenção do crescimento celular.

Gatfield (1988) observou que a degradação do ácido ricinoleico pode, além de formar γ -decalactona, seguir outras vias para a formação de outras lactonas (3-hidroxi- γ -decalactona, 2-decen-4-olido e 3-decen-4-olido), o que pode contribuir para o baixo rendimento do aroma.

A acidificação do meio de cultura pelas leveduras pode influenciar significativamente a lactonização do aroma (Endrizzi *et al.*, 1995). Assim, neste trabalho monitorizou-se o pH ao longo do tempo para os quatro meios utilizados na biotransformação do óleo de rícino em γ -decalactona pela levedura *Yarrowia lipolytica* W29 (Figura 4.10).

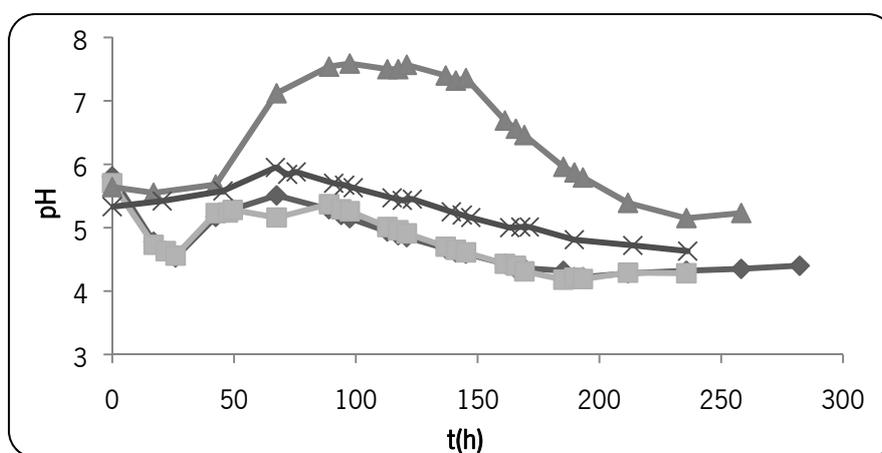


Figura 4. 10 - Variação do pH do meio ao longo do tempo: Lipase/OR (◆), Lipase/ORH (■), MB (▲) e MB/Azeite (×).

Observando a figura 4.10 verifica-se o mesmo pH inicial (em torno de 5.5) para os quatro meios analisados.

Para os meios Lipase/OR e Lipase/ORH, observa-se uma diminuição do pH até 4.5, às 26 horas, com um aumento subsequente até pH 5.5 por volta das 68 horas. De seguida ocorre um abaixamento até pH 4.5, observando-se uma estabilização do pH em torno deste valor a partir das 236 horas.

Já para o meio MB observou-se um maior aumento do pH até ser atingido pH 7.5 às 112 horas, diminuindo de seguida até pH 5.5.

No caso do meio MB/Azeite, ocorre um ligeiro aumento de pH até 6 às 68 horas, com um decréscimo subsequente até às 186 horas, atingindo-se valores de pH de 4.6.

Pode ainda verificar-se que o pH máximo é atingido quando se começa a detectar aroma no meio. A acidificação do meio a partir deste momento pode estar relacionada com o aumento

da quantidade de lipase, uma vez que haverá uma maior hidrólise dos triglicerídeos presentes, libertando-se ácidos gordos e glicerol, o que conduz a uma diminuição do pH. No caso do meio MB, como é necessário que a levedura produza as lipases para hidrolisar o óleo de rícino, o pH do meio atinge valores mais elevados.

Por sua vez Endrizzi *et al.* (1995) utilizando *Candida intermedia* para a produção de γ -decalactona, partiram de um pH inicial de 5.6 tendo observado uma acidificação do meio até se atingir pH 3, após 48 horas de incubação.

Na Figura 4.11 são apresentados os perfis de crescimento da levedura *Y. lipolytica* W29, para cada um dos meios testados.

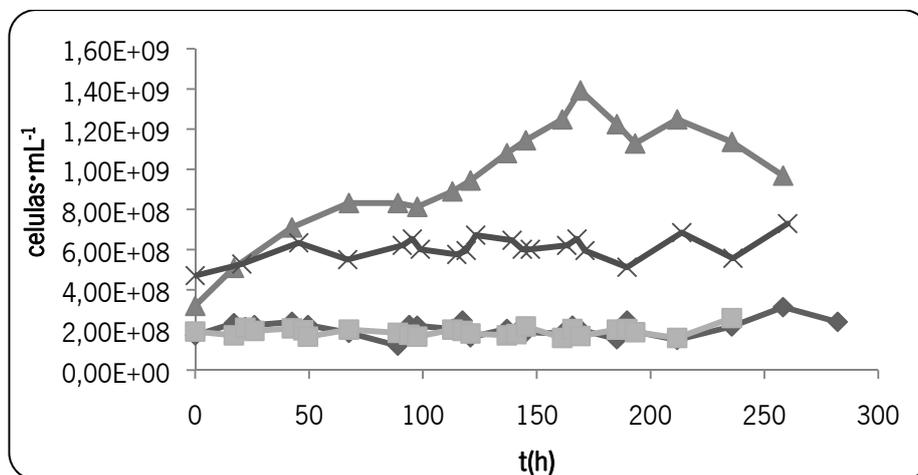


Figura 4. 11 - Perfis de crescimento da levedura *Y. lipolytica* W29 para os vários meios testados: Lipase/OR (◆), Lipase/ORH (■), MB (▲) e MB/Azeite (×).

Na figura anterior podem observar-se duas zonas distintas no gráfico: uma que corresponde aos ensaios em que as células foram centrifugadas (Lipase/OR e Lipase/ORH) e outra que se refere aos ensaios em que não se efectua o passo prévio de centrifugação das células (MB e MB/Azeite). Estas diferenças observadas entre os diferentes meios podem estar relacionadas com a composição química do meio. Nos meios Lipase/OR e Lipase/ORH como são removidos os componentes do meio de crescimento, a única fonte de carbono presente é o óleo de rícino, o que torna o meio comparativamente mais pobre em fontes de carbono necessárias para o crescimento celular. No caso dos meios MB e MB/Azeite, além do óleo de rícino ainda estão presentes componentes residuais do meio de crescimento, o que torna o meio

mais rico em azoto e carbono, componentes estes necessários ao crescimento e duplicação celular (Monod, 1949).

4.5.2- Influência da agitação na produção de γ -decalactona

A influência da agitação na produção de γ -decalactona foi estudada em várias biotransformações com diferentes condições experimentais (diferentes velocidades de agitação e meios de biotransformação).

Trabalhos descritos na literatura de produção de γ -decalactona em matraz são normalmente levados a cabo à velocidade de agitação de 140 rpm (Waché *et al.*, 2002).

Com o intuito de avaliar a influência do aumento da agitação na produção do aroma, realizaram-se ensaios a 240 rpm. Na Figura 4.12 são apresentados os resultados obtidos a esta velocidade de agitação.

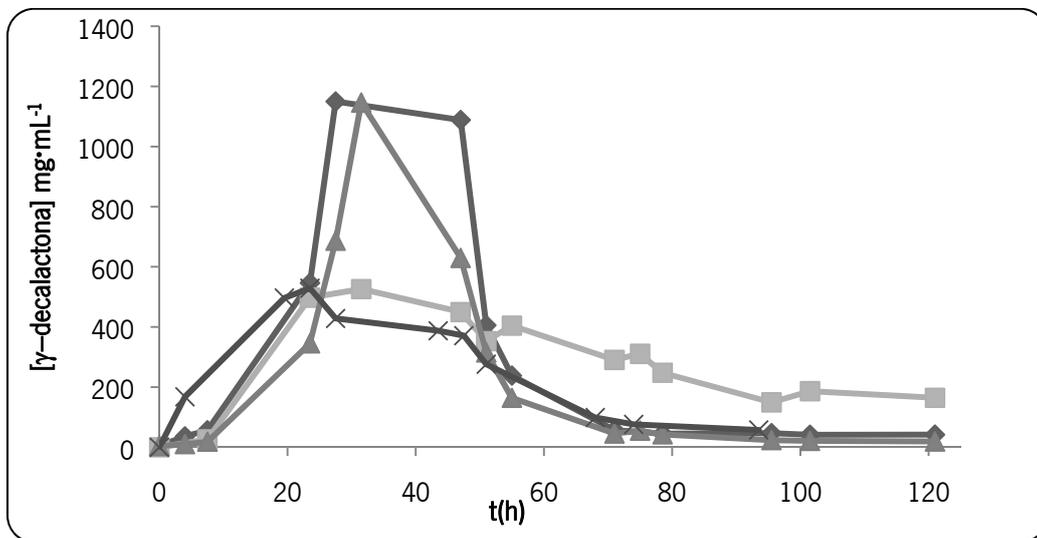


Figura 4. 12 - Produção de γ -decalactona a 240 rpm, para diferentes composições do meio de biotransformação: Lipase/OR (◆), MB (■), Lipase/ORH (▲) e MB/Azeite (×).

Analisando a figura anterior é possível verificar que, para todos os ensaios realizados, começa-se a detectar produção de γ -decalactona a partir das 7.5 horas de biotransformação, tendo-se obtido a produção máxima do aroma a cerca de 30 horas de cultura. Quando comparados estes valores com os obtidos para a velocidade de agitação de 140 rpm, pode

verificar-se que a produção de aroma é mais tardia para a agitação inferior, o que pode estar relacionado com a menor transferência de oxigênio nestas condições e também com a menor área de contacto entre as células e o meio. De acordo com Kamarudin *et al.* (2008), velocidades de agitação superiores levam à redução do tamanho das gotas do óleo, diminuindo a área de contacto entre o substrato e as células presentes na fase aquosa.

Se compararmos a produção máxima de γ -decalactona nos vários ensaios realizados, verifica-se que para o meio Lipase/OR obteve-se uma produção máxima de $1150 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para o meio Lipase/ORH, $1146 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para os meios MB e MB/Azeite a concentração máxima de aroma detectada foi de $526 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $529 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Assim, a maior concentração de γ -decalactona é obtida quando se adicionam ao meio enzimas extracelulares e óleo de rícino previamente hidrolisado, uma vez que nestas condições o óleo de rícino é mais facilmente hidrolisado em ácido ricinoleico, precursor da γ -decalactona, como já foi explicado anteriormente.

Confrontando a produção máxima deste composto nos vários ensaios apresentados a 240 rpm com os obtidos a 140 rpm, verifica-se que para os meios Lipase/OR e Lipase/ORH obtém-se uma maior produção de aroma para uma velocidade de agitação superior. No entanto, para MB e MB/Azeite a concentração de aroma obtida é bastante inferior, o que pode estar relacionado com o stress celular causado pela agitação.

Na Tabela 4.9 apresentam-se os valores de produtividade obtidos para os vários ensaios realizados.

Tabela 4. 9 – Valores de produtividade para as diferentes potências de agitação e meios analisados.

Meio	Potência de agitação (rpm)	Produtividade (mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)
Lipase/ORH	140	7.89 ± 1.18
Lipase/OR		7.70 ± 1.15
MB		8.33 ± 1.24
MB/Azeite		8.77 ± 1.31
Lipase/ORH	240	41.82 ± 6.27
Lipase/OR		36.38 ± 5.45
MB		22.51 ± 2.50
MB/Azeite		16.70 ± 3.37

Através da análise da tabela anterior é possível verificar que os valores de produtividade mais elevados são obtidos para a potência de agitação de 240 rpm. Nos ensaios realizados a 140 rpm, apesar de serem obtidas concentrações de aroma mais elevadas, o processo é mais moroso, o que conduz a valores de produtividade mais baixos.

No conjunto de ensaios realizados a uma agitação de 140 rpm os valores de produtividade obtidos não são significativamente diferentes, o que pode ser comprovado analisando os intervalos de erro associados a cada valor de produtividade. Tal facto permite concluir que para esta velocidade de agitação a adição de lipases extracelulares ou de um indutor de produção de lipase, não melhora o rendimento de produção de γ -decalactona.

No caso em que se aplica uma potência de agitação superior (240 rpm), os valores de produtividade mais elevados são obtidos para os ensaios em que se adiciona lipase extracelular ao meio de biotransformação (meios Lipase/OR e Lipase/ORH), uma vez que, tal como já foi referido, o aumento da velocidade de agitação vai reduzir o tamanho das gotas do óleo, aumentando a área de contacto entre o óleo e a enzima presente na fase aquosa (Kamarudin *et al.*, 2008).

As diferenças observadas nos valores de produtividade obtidos para as duas velocidades de agitação estão relacionadas com o facto de a levedura utilizada ser aeróbia e uma velocidade de agitação superior propiciar uma maior dispersão do oxigénio no meio, conduzindo a uma maior produção de biomassa e de lipase, aumentando por sua vez a eficiência do processo. No entanto, quando se utilizam condições de agitação superiores, pode provocar-se stress celular, alteração da morfologia e diminuição da viabilidade celular.

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO



Neste capítulo são apresentadas as conclusões do trabalho e as sugestões para desenvolvimento de trabalhos futuros.

No que diz respeito ao estudo de validação do método de determinação da actividade lipolítica, constatou-se que o método que utiliza como substrato o *p*-nitrofenil laurato é, de uma forma geral, linear para a gama de concentrações de enzima compreendidas entre 0 e 0.008 mgmL⁻¹. Também se obtêm resultados lineares para concentrações de enzima entre 0 e 0.12 mgmL⁻¹, para o substrato *p*-nitrofenil butirato. Relativamente ao limite de detecção foi obtido o valor de 0.0008 mgmL⁻¹ e 0.0016 mgmL⁻¹, para o substrato *p*-NPL e *p*-NPB, respectivamente. Quanto ao limite de quantificação foi auferido o valor de 0.0026 mgmL⁻¹, para o *p*-NPL e de 0.0055 mgmL⁻¹, para o *p*-NPB.

Concluiu-se porém que o método experimental que utiliza o substrato *p*-NPL não é preciso, contrariamente ao que utiliza o *p*-NPB, que fornece resultados mais precisos. Assim, no método adoptado para a determinação da actividade de lipase nos ensaios de caracterização das enzimas seleccionou-se como substrato o *p*-nitrofenil butirato.

Relativamente à actividade lipolítica das várias enzimas comerciais estudadas verificou-se que a lipase de *C. rugosa* apresenta valores de actividade superiores aos das outras lipases analisadas (5.873 U•mg⁻¹_{enzima}). Os menores valores de actividade de lipase foram detectados com a enzima CALB L (0.135 U•mg⁻¹_{enzima}).

Nos ensaios de hidrólise do óleo de rícino verificou-se que todas as lipases testadas foram capazes de hidrolisar o óleo de rícino, sendo que a maior percentagem de hidrólise (95.37 %) foi obtida quando se utilizou a enzima Lipozyme TL IM, a pH 8 e 27 °C, ao fim de 45 horas. Assim, esta lipase foi seleccionada para hidrolisar o óleo de rícino usado como precursor para a produção de γ -decalactona no meio de biotransformação, uma vez que demonstrou ser uma enzima bastante estável relativamente às variações ambientais, nomeadamente pH e temperatura, além de conduzir à obtenção de elevadas percentagens de hidrólise do óleo de rícino.

Foi demonstrado que para as estirpes *Y. lipolytica* IMUFRJ 50869 e *Y. lipolytica* W29, se obtêm uma maior produção de lipase quando não se efectua o passo prévio de centrifugação das células na transferência das células do meio de crescimento para o meio de produção de lipase. Além disso, conclui-se que a adição de azeite ao meio de produção incrementa a produção desta enzima, para as três estirpes estudadas. Na ausência de azeite, as actividades lipolíticas extracelulares máximas foram de 95.6 U•L⁻¹ e 142.0 U•L⁻¹ para as estirpes, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS2073, respectivamente, sendo que para a *Y. lipolytica* W29

não foi detectada actividade na ausência de azeite. Adicionando azeite, as actividades foram de 448.6 U·L⁻¹, 117.6 U·L⁻¹ e 415.2 U·L⁻¹, para as estirpes *Y. lipolytica* W29, *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862 e *Y. lipolytica* CBS 2073, respectivamente.

Assim, as condições com as quais se obtém uma maior produção de lipase, para a estirpe *Y. lipolytica* W29 são quando estão presentes o azeite e uma fonte de carbono (515.8 U·L⁻¹ e 1008.9 U·L⁻¹, lipase extracelular e total). Contudo, para a estirpe *Y. lipolytica* IMUFRJ 50862, a maior produção de lipase é obtida na presença de uma fonte de carbono (278.9 U·L⁻¹) e para a *Y. lipolytica* CBS 2073, é a adição de azeite ao meio que provoca uma maior produção de lipase (415.2 U·L⁻¹).

Como os valores de actividade lipolítica extracelular obtidos para a estirpe *Y. lipolytica* W29 foram superiores aos alcançados para as outras estirpes analisadas, esta levedura foi seleccionada para os ensaios posteriores de produção de lipase.

Relativamente ao efeito da composição do meio na produção de lipase verificou-se que, para a estirpe *Yarrowia lipolytica* W29, a maior produção de lipase é obtida quando se utiliza o meio YNB/RM, sendo obtidos valores de actividade lipolítica máxima extracelular e total de 576.9 U·L⁻¹ e 2017.65 U·L⁻¹, respectivamente. O melhor indutor para a produção de lipase, nas condições analisadas, é o ricinoleato de metilo.

No que diz respeito ao efeito da composição do meio na produção de γ -decalactona, conclui-se que as maiores concentrações de aroma são obtidas para o meio de biotransformação, MB (1600 mg·mL⁻¹). Verificou-se ainda que a velocidade de agitação influencia o processo de produção de γ -decalactona, sendo que os valores de produtividade mais elevados são obtidos para a velocidade de agitação de 240 rpm. Nos ensaios realizados a 140 rpm, apesar de serem obtidas concentrações de aroma mais elevadas, o processo é mais moroso, o que conduz a valores de produtividade mais baixos.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho sugere-se como perspectivas futuras os seguintes tópicos:

- Caracterizar e purificar a lipase produzida pela levedura.
- Monitorizar a hidrólise do óleo por lipase medindo os ácidos gordos libertados por GC e o glicerol por HPLC.
- Implementar técnicas de imobilização das células de *Y. lipolytica*, utilizando vários agentes imobilizadores.
- Estudar a produção de γ -decalactona em bioreactor com células imobilizadas, testando vários tipos de reactor, como por exemplo um reactor mecanicamente agitado e um reactor do tipo “air-lift”.
- Testar a metodologia de fed-batch, adicionando continuamente meio ao reactor, de modo a maximizar a produção do aroma.
- Análise dos aromas produzidos e dos substratos hidrofóbicos consumidos, como por exemplo a técnica de SPME (Micro-Extracção em Fase Sólida).
- Alargar o estudo a outras leveduras de interesse industrial, que sejam capazes de produzir γ -decalactona.

CAPÍTULO 6 - BIBLIOGRAFIA



Neste capítulo enumeram-se as referências bibliográficas que serviram de suporte para a realização deste trabalho.

Aguedo, M.; Gomes, N.; Garcia, E.E.; Waché, Y.; Mota, M.; Teixeira, J.A.; Belo, I. (2005) Decalactone production by *Yarrowia lipolytica* under increased O₂ transfer rates. *Biotechnol. Lett.* 27: 1617-1621.

Aguedo, M.; Ly, M.H.; Belo, I.; Teixeira, J.A.; Belin, J.-M.; Waché, Y. (2004) The use of enzymes and microorganisms of the production of aroma compounds from lipids. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 327-336.

Aguedo, M. (2002) Biotransformation de lipides en arômes par *Yarrowia lipolytica*: interactions avec le substrat, excrétion et toxicité des métabolites produits. Tese de doutoramento. Université de Bourgogne, Dijon, France.

Amaral, P.F.F. (2007) Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em bioreactor multifásico. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

Amaral, P.F.F. (2003) Emprego de Carreador de Oxigénio na Produção de Lipase por *Yarrowia lipolytica*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

Arroyo, M.; Sanchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V. (1999) Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme. Microb. Technol.* 24: 3-12.

Asther, M.; Haon, M.; Roussos, S.; Record, E.; Delaltre, M.; Lesage-Meesen, L.; Labat, M. (2002) Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Proc. Biochem.* 38: 685-691.

Babu, I.S.; Rao, G.H. (2007) Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 in solid state fermentation using mixed substrate. *J. Microbiol.* 2: 469-474.

Beisson, F.; Tiss, A.; Rivière, C.; Verger, R. (2000) Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 133-153.

Barth, G.; Gaillardin, C. (1997) Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol. Rev. 19: 219-237.

Beckerich, J.M.; Boisramé-Baudevin, A.; Gaillardin, C. (1998) *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. Internatl. Microbiol. 1: 123-130.

Bendicho, S.; Trigueros, M.C.; Hernández, T.; Martín, O. (2001) Validation and Comparison of Analytical Methods Based on the Release of *p*-Nitrophenol to Determine Lipase Activity in Milk. J. Dairy Sci. 84: 1590–15.

Brígida, A.I.S.; Amaral, P.F.; Gonçalves, I.R.; Coelho, M.A.Z. (2007) Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. European Congress of Chemical Engineering ECCE 6, 2007, Copenhagen. ECCE-6 Book of Abstracts. Denmark: Norhaven Book, v. 2.

Bueno, T (2000) Obtenção de concentrados de ácidos graxos polinsaturados por hidrólise enzimática do óleo de soja. Tese de Mestrado, Universidade de Engenharia Química de Lorena. São Paulo, Brasil.

Burkert, J.F.M. (2003) Optimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil.

Cabral, J.M.S.; Airres-Barros, M.R.; Gama, M. (2003) Engenharia Enzimática. Lidel, Lisboa, Portugal.

Castro, H.F.; Mendes, A.A.; Santos, J.C. (2004) Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Q.N. 27: 146-156.

Cardillo, R.; Fuganti, C.; Sacerdote, C.; Barbeni, M.; Cabella, P.; Squarcia, F. (1989) Process for the microbiological production of gamma-decalactone (R) and gamma-octalactone (R). Patent EP 356291.

Chartrain, M.; Katz, L.; Marcin, C.; Thien, M.; Smith, S.; Fisher, F.; Goklen, K.; Salmon, P.; Brix, T.; Price, K.; Greasham, R. (1993) Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 575–80.

Cavalcanti, E.A.C.; Gutarra, M.L.E.; Freire, D.M.G.; Castilho, L.R.; Junior, G.L.S. (2005) Lipase Production by Solid-State Fermentation in Fixed-Bed Bioreactors. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48: 79-84.

Corzo, G; Revah, S (1999). Production and characteristics of lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresour. Technol.* 70: 173–180.

Couto, S.R.; Sanromam, M.A. (2006) Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *J. Food Eng.* 76: 291– 302.

Cunha, A.G. (2007) Purificação e imobilização de lipases microbianas em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

Currie, L.A. (1999) Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Anal. Chim. Acta.* 391: 127-134.

Currie, L.A.; Svehla, G. (1994) Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis. *Pure Appl. Chem.* 3: 595-908.

Dalmau, E.; Montesinos, J.L.; Casas, C. (2000) Effect of different sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 657-663.

Destain, J.; Roblain, D.; Thonart, P. (1997) Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 19 (2): 105-107.

Dieckelmann, G.; Heinz, H.J. (1988) The basic of industrial oleochemistry: a comprehensive survey of selected technologies based on natural oils and fats. Mülheim/Ruhr, Germany: Peter Pomp GmbH (referido em Bueno, 2005).

Dominguez, A.; Deive, F.J.; Sanromán, M.A.; Longo, M.A. (2003) Effect of lipids and surfactants on extracellular lipase production by *Yarrowia lipolytica*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 78: 1166-1170.

Dubal, S.K.; Tilkari, Y.P.; Momin, S.A.; Borkar, I.V. (2008) Biotechnological routes in flavour industries. Advanced Biotech. 6: 20-31.

Dufossé, L.; Feron, G.; Mauvais, G.; Bonnarme, P.; Durand, A.; Spinnler, H.-E. (1998) Production of γ -decalactone and 4-hydroxy-decanoic acid in the genus *Sporodiobolus*. J. Ferment. Bioeng. 86(2): 169-173.

Elibol, M.; Ozer, D. (2001) Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. Process Biochem. 36: 325-9.

Ellaiah, P.; Prabhakar, T.; Ramakrishna, B.; Taleb, T.A.; Adinarayana, K. (2004) Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Process Biochem. 39: 525-528.

Endrizzi, A.; Belin, J.M. (1995) Bioconversion of methyl ricinoleate to 4-hydroxy-decanoic acid and to γ -decalactone by yeast of genus *Candida*. J. Basic Microbiol. 35: 285-295.

Endrizzi, A.; Awadé, A.C.; Belin, J.M. (1993) Presumptive involvement of methyl ricinoleate β -oxidation in the production of γ -decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. Microbiol. Lett. 114: 153-160.

Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Guerrini, A.; Medici, A.; Pedrini, P.; Fontana, S. (2001) Enantioselective hydrolysis with *Yarrowia lipolytica*: a versatile strain for esters, enol esters, epoxides and lactones. Tetrahedron Assymetry 12: 2709-2713.

Farbood, M.I.; Willis, B.J. (1983) Production of gamma-decalactone. Patent WO 8301072.

Fernandez, M.L.M.; Krieger, N.; Baron, A.M.; Zamoraa, P.P.; Ramosa, L.P.; Mitchell, D.A. (2004) Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. J. Mol. Catal. B: Enzym. 30: 43-49.

Fickers, P.; Nicaud, J.M.; Destain, J.; Thonart, P. (2003) Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63: 136–142.

Fuganti, C.; Grasselli, P.; Barbeni, M. (1991) Biogenesis of aromas: gamma and delta lactones from C6 to C12. Nato ASI series: Series A Life Sci. 207: 1-17 (referido em Pagot, 1998).

Gandhi, N.N. (1997) Application of lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 74:621-634.

Gão Y., Breuil C. (1995) Extracellular lipase production by a sapwood-staining fungus *Ophiostoma piceae*. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 638–42.

Gatfield, I.L.; Güntert, M.; Sommer, H.; Werkhoff, P. (1993) Some aspects of the microbiological production of flavour-active lactones with particular reference to γ -decalactone. Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. 15: 165-170.

Gatfield, I.L. (1988) Production of flavor and aroma compounds by biotechnology. Food Technol. 190: 110-123 (referido em Lee *et al.*, 1995).

Genovefa, Z.; Wenzig, E.; Mersmann, A. (1994) Improvement of lipase production by addition of catalase during fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 650-652.

Gomes, N. (2005) Efeito do oxigénio na biotransformação de lípidos em aromas pela levedura *Yarrowia lipolytica*. Tese de Mestrado. Universidade do Minho. Braga, Portugal.

Giuseppin, M.L.F. (1984) Effects of dissolved oxygen concentration on lipase production by *Rhizopus delemar*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 161-165.

- Gonçalves, F.A.G. (2007) Produção de lipase extracelular por leveduras em cultivo submerso. Tese de mestrado. Faculdade de Farmácia da UFMG. Belo Horizonte, Brasil.
- Gordillo, M.A.; Obradors, N.; Montesinos, J.L.; Valero, F.; Lafuente, J.; Sola, C. (1995) Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. Appl. Microbiol. 43: 38–41.
- Guieysse, D.; Sandoval, G.; Faure, L.; Nicaud, J.-M.; Monsan, P.; Marty, A. (2004) New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. Tetrahedron Assymetry 15: 3539-3543.
- Gustone, F.D. (1999) Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. J. Sci. Food Agric. 79: 1535-1549.
- Gutiérrez-Ayesta, C.; Carelli, A.A.; Ferreira, M.L. (2007) Relation between lipase structures and their catalytic ability to hydrolyse triglycerides and phospholipids. Enzyme Microb. Technol. 41: 35-43.
- Hadeball, W. (1991) Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. Acta Biotechnol. 11: 159-167.
- Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. (2006) Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb. Technol. 39: 235–251.
- Hanssen, H.P. (1989) Fermentative Gewinnung von Duft-und Aromastoffen aus Pizkulturen. GIT. Fachz. Lab. 33: 996-1004.
- Hegedus, D.D.; Khachatourians, G.G. (1988) Production of an extracelular lipase by *Beauveria Bassiana*. Biotechnol. Lett. 9: 637-642 (referido em Dubal *et al.*, 2008).
- Hernández-Martín, E.; Otero, C. (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. Bioresour. Technol. 99: 277-286.

Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. (1999) Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 421–430.

Holzschu, D.L.; Chandler, F.W.; Ajello, L.; Ahearn, D.G. (1979) Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia* 17: 71-78.

Horwitz, W. (1982) Evaluation of analytical methods used for regulation of food and drugs. *Anal. Chem.* 54: 67-76.

Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. (2004) Lipase and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 3: 118-125.

Ito, T.; Kikuta, H.; Nagamori, E.; Honda, H.; Ogino, H.; Ishikawa, H.; Kobayashi, T. (2001) Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 245–50.

Iwai, M.; Tsujisaka, Y. (1984) Fungal lipase. In *Lipases: Howard L. Brockman (Eds)*. Amsterdam: Elsevier. 443-469 (referido em Lima et al., 2003).

Janssen, P.H.; Monk, C.R.; Morgan, H.W. (1994) A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp., and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 195–200.

Jette, J.F.; Ziomek, Z. (1994) Determination of Lipase Activity by a Rhodamine-Triglyceride-Agarose Assay. *Anal. Biochem.* 219: 256-260.

Kamarudin, A. H.; Serri, N. A.; Rahaman, S. N. A. (2008) Preliminary studies for production of fatty acids from hydrolysis of cooking palm oil using *C.rugosa* lipase. *J. Phys. Scienc.* 19: 79-88

Kawasse, F. M.; Amaral, P. F.; Rocha-Leão, M. H. M.; Amaral, A. L.; Ferreira, E. C.; Coelho, M. A. Z. (2003) Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 25: 371–375.

Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T. (1998) Biotransformations with lipases. In: Rehm HJ, Pihler G, Stadler A, Kelly PJW, editors. *Biotechnology*. 8: 37–192 (referido em Sharma, 2001).

Khor, H. T.; Tan, N. H.; Chua, C.L. (1986) Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 538-540.

Kim, H.K., Lee, J.K., Kim, H.; Oh, T.K. (1996) Characterization of an alkaline lipase from *Proteus vulgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 117–21 (referido em Sharma, 2001).

Koblitz, M.G.B.; Pastore, G.M. (2004) Purificação parcial, por dois métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.* *Cienc. Tecnol. Aliment.* 24: 287-292.

Kohno, M.; Kugimiya, W., Hashimoto, Y.; Morita, Y. (1994) Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58: 1007–12 (referido em Sharma, 2001).

Kok, R. G.; Thor, J. J. V.; Roodzant, I. M. N; Brouwer, M. B.W.; Egmond, M. R.; Nudel, C. B.; Vosman, B.; Hellingwer, K. J. (1995) Characterization of the extracellular lipase lipA of *Acinetobacter colcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Mol. Microbiol.* 15: 803–18.

Kouker, G.; Jaeger, K. E. (1987) Specific and Sensitive Plate Assay for Bacterial Lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 211-213.

Kulkarni, N. e Gadre, R.V. (1999). A novel alkaline, thermostable, protease-free lipase from *Pseudomonas sp.* *Biotechnol. Lett.* 21: 897-899.

- Kümin, B.; Munch, T. (1997) Process for the preparation of a lactone. Patent EP 0795607.
- Lee, S.L.; Lin, S.-J.; Chou, C.-C. (1995) Growth and production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odorus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. J. Ferment. Bioeng. 80(2): 195-199.
- Lee, S.Y.; Rhee, J.S. (1993) Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. Enzyme Microb. Technol. 15: 617–24.
- Leidler, K.J.; Peterman, B.F. (1979) Temperature effects in enzyme kinetics. In: D.L. Purich, Editor, Methods in Enzymology Academic Press, New York 63: 234–257.
- Levinson, W.; Kurtzman, C.; Kuo, T.M. (2007) Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. Enzyme Microb. Technol. 41: 292-295.
- Lima, V.M.G.; Krieger, N.; Sarquis, M.I.M.; Mitchell, D.A.; Ramos, L.P.; Fontana, J.D. (2003) Effect of different nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technol. Biotechnol. 41: 105-110.
- Linfield, W.M.; Barauskas, R.A.; Sivieri, L.; Serota, S.; Stevenson, R.W. (1984) Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. J. Am. Oil Chem. Soc. 61: 191-195.
- Lock, L.L. (2007) Seleção de leveduras lipolíticas isoladas de bromélias e produção e caracterização de lipase bruta de *Debaryomyces melissophilus* BI81. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil.
- Long, K.; Ghazali, H.M.; Ariff, A. (1996) Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus favus* link: Pattern and factors involved in its production. J. Chem. Tech. Biotechnol. 67: 157-163.
- Long, G.L.; Winefordner, J.D. (1983) Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. Anal. Chem. 55: 712-724.

Lopes, M.; Gomes, N.; Gonçalves, C.; Coelho, M.A.Z.; Mota, M.; Belo, I. (2008) *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. Lett. Applied Microbiol. 46: 255–260.

Lopes, M. (2007) Produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*: Optimização da composição do meio e condições de arejamento. Tese de mestrado. Universidade do Minho. Braga, Portugal.

Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde, K.B.; Khire, J.M.; Gokhale, D.V. (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Process Biochem. 38: 715-721.

Martins, T.S.M. (2001) Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (referido em Ribeiro, 2008).

Monod, J. (1949) The growth of bacterial cultures. Annu. Rev. Microbiol. 3: 371-394.

Montesinos, J.L.; Osbradors, N.; Gordillo, M.A.; Valero, F.; Lafuente, J. (1996) Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 25-37.

Mukataka, S.; Kobayashi, T.; Takahashi, J. (1985) Enzymatic Hydrolysis of Fats at High Substrate Concentrations in Biphasic Organic-Aqueous Systems. J. Ferment. Technol. 65: 23-29.

Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M.; Pagot, Y.; Endrizzi-Joran, A. (1996) Bioconversion of substrate with microbe auxotrophic for compound in medium deficient in this compound. FR2734843.

Ogrydziak, D.M. (1988) Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica* CRC. Crit. Ver. Biotechnol. 8: 177-187.

Okui, S.; Uchiyama, M.; Mizugaki, M. (1963) Metabolism of hydroxy fatty acids: II. Intermediates of the oxidative breakdown of ricinoleic acid by genus *Candida*. J. Biochem. 54: 536-540.

Ong, A.L.; Kamaruddin, A.H.; Bhatia, S.; Long, W.S.; Lim, S.T.; Kumari, R. (2006) Performance of free *Candida antarctica* lipase B in the enantioselective esterification of (*R*)-ketoprofen. *Enzyme Microbiol. Technol.* 39: 924-929.

Ota, Y.; Komakazu, G.; Shigeaki, K.; Sugiura, T.; Minoda, Y. (1982) Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* 46: 2885-2893.

Orçaire, O.; Buisson, P.; Pierre, A.C. (2006) Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 42: 106-113.

Ory, R.L.; St. Angelo, A.J.; Altschul, A.M. (1962) The acid Lipase of the castor bean: Properties and substrate specificity. *J. Lipid Res.* 3: 99–105.

Pagot, Y.; Waché, Y.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M. (1998) Peroxisomal β -oxidation activities and γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 295-300.

Pagot, Y. (1997) Étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la β -oxidation peroxisomale chez les levures. Effets sur la biotransformation du ricinoléate de méthyle en γ -décalactone. Tese de doutoramento, Université de Bourgogne, Dijon, France (referido em Aguedo, 2002).

Pagot, Y.; Endrizzi, A.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M. (1997) Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve γ -decalactone production yields. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 113–116.

Papaparaskevas, D.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Macris, B.J. (1992) Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnol. Lett.* 14: 397– 402.

Park, Y.K.; Pastore, G.M.; Almeida, M.M. (1988) Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65: 252-254.

Pereira-Meirelles, F.V.; Rocha-Leão, M.H.M.; Sant'Anna Jr., G.L. (2000) Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.* 22: 71–75.

Pereira-Meirelles, F. V.; Rocha-Leão, M. H. M.; Sant'Anna Jr., G. L. (1997) A stable lipase from *Candida lipolytica*, cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 73-85.

Peters, I.; Nelson, F. (1948) Preliminary characterization of lipase of *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.* 55: 593-600.

Pignede, G.; Wang, H.; Fudalej, F.; Gaillardin, C.; Seman, M.; Nicaud, J.-M. (2000) Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.* 182 (10): 2802-2810.

Pinheiro, T.L.F. (2006) Produção de lipase por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. Tese de mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim, Brasil.

Pinto, G.A.S. (1998) Produção de uma Mistura Enzimática Hidrolítica por *Aspergillus Níger* 3T5B8 em Fermentação Submersa. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.

Pokorny, D.; Friedrich, J.; Cimerman, A. (1994) Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 16: 363–6.

Puthli, M.; Rathod, V.K.; Pandit, A.B. (2006) Enzymatic hydrolysis of castor oil: Process intensification studies. *Biochem. Eng. J.* 31: 31-41.

Rajendran, A.; Palanisamy, A.; Thangavelu, V. (2009) Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brz. Arch. Biol. Technol.* 52: 207-219.

Rathod, V.K.; Pandit, A.B. (2009) Effect of various additives on enzymatic hydrolysis of castor oil. *Biochem. Eng. J.* 47: 93– 99.

Ribeiro, B.D. (2008) Aplicação de Tecnologia Enzimática na Obtenção de β -Caroteno a partir de Óleo de Buriti (*Mauritia vinifera*). Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Rooney, D.; Weatherley, L.R. (2001) The effect of reaction conditions upon lipase catalyzed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. *Process Biochem.* 36: 947-53.

Salleh, A.B.; Musani, R.; Basri, M.; Ampon, K.; Yunus, W.M.Z.; Razak, C. N. A. (1993) Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Can. J. Microbiol.* 39: 978–81.

Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B.; Davidson, W.S. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J. Microbiol. Methods* 52: 1-18.

Schrader, J.; Etschmann, M.M. W.; Sell, D.; Hilmer, J.-M.; Rabenhorst, J. (2004) Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds – current industrial processes and future prospects. *Biotechnol. Lett.* 26: 463-472.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001) Production, purification, characterization and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.

Sharon, C.; Furugoh, S.; Yamakido, T.; Kato, Y.; Ogawa, H. (1998a) Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20: 304-307.

Sharon, C.; Nakazato, M.; Ogawa, H.; Kato, Y. (1998) Lipase-induced hydrolysis of castor oil: effect of various metals. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21: 292-295.

Shimada, Y.; Sugihara, A.; Nagao, T.; Tominaga, Y. (1992) Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long-chain fatty acids. J. Ferment. Bioeng. 74: 77– 80 (referido em Dalmau *et al.*, 2000).

Shimizu, S.; Kataoka, M.; Shimizu, K.; Hirakata, M.; Sakamoto, M.; Yamada, H. (1992) Purification and characterization of a novel lactonohydrolase, catalyzing the hydrolysis of aldonate lactones and aromatic lactones, from *Fusarium oxysporum*. Eur. J. Biochem. 209: 383-390.

Sierra G. (1957) A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek. 23: 15–22.

Simons, J.W.; Kampen, M.D.; Riel, S.; Gotz, F.; Egmond, M.R.; Verhey, H.M. (1998) Cloning, purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis* – comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. Eur. J. Biochem. 253: 675–83.

Snellman, E.; Sullivan, E.R.; Colwell, R.R. (2002) Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter sp.* Biochem. Eng. J. 11: 269-274.

Stuer, W.; Jaeger, K. E.; Winkler, U.K. (1986) Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 3: 1070-1074.

Sigihara, A.; Tani, T.; Tominaga, Y. (1991) Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* J. Biochem. 109: 211–216.

Tipton, K.F.; Dixon, H.B. (1979) Effects of pH on enzymes. Methods Enzymol. 63: 183–234

Waché, Y.; Aguedo, M.; Choquet, A.; Gatfield, I.; Nicaud, J.-M., Belin, J.-M. (2001) Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol. 67(12): 5700-5704.

Waché, Y.; Aguedo, M.; Le Dall, M.-T.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M. (2002) Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production. J. Mol. Catal. B: Enzym. 5: 347-351.

Waché, Y.; Pagot, Y.; Nicaud, J.-M.; Belin, J.-M. (1998) Acyl-CoA oxidase, a key step for lactone production by *Yarrowia lipolytica*. J. Mol. Catal. B: Enzym. 5: 165-169.

Wang, Y.; Srivastava, K.C.; Shen, G.J.; Wang, H. Y. (1995) Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). J Ferment. Bioeng. 79: 433-438.

Wang, Y.J.; Sheu, J.Y.; Wang, F.F.; Sahw, J.F.; (1988) Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnol. Biochem. 31: 628-633.

Winkler, U.K.; Stuckmann E.; Glycogen M. (1979) Glycogen Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 3: 663-670.

Wooley, P.; Peterson, S.B. (1994) Lipase: Their Structure, Biochemistry and Application. Cap.12. Cambridge University Press (referido em Pinheiro, 2006).

Yeoh, H. H; Wong, F. M; Lin, G. (1986) Screening for fungal lipases using chromogenic lipid substrates. Mycologia 78: 298-300.

Yoshida, Y.; Kimura, Y.; Kadota, M.; Tsuno, T.; Adachi, S. (2006) Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized *Candida antarctica* lipase at high temperature. Biotechnol. Lett. 28: 1471-1474.

ANEXOS



Nas próximas páginas serão apresentadas as rectas de calibração efectuadas ao longo do trabalho prático.

A.1 Curvas de Calibração

A.1.1 Curva de calibração da biomassa

A quantificação da biomassa, em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, foi efectuada através da curva de calibração obtida para o microrganismo em estudo.

Na Tabela A.1.1 apresenta-se a expressão representativa da recta de calibração para a concentração celular.

Tabela A.1.1 – Expressão da recta de calibração da biomassa.

Microrganismo	Gama de validade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Equação	
		$A_{600\text{ nm}} = (m \pm S_m) \times C + (b \pm S_b)$	
		$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$
<i>Yarrowia lipolytica</i>			
W29	0.04 - 0.9	(0.9501 ± 0.06)	(0.0115 ± 0.02)

Sendo:

$A_{600\text{ nm}}$, a absorvância lida a 600 nm

m , o declive da recta

S_m , o erro padrão associado ao declive

b , a ordenada na origem da recta

S_b , o erro padrão associado à ordenada na origem

C , a concentração celular, em $g \cdot L^{-1}$

A.1.2 Curva de calibração do GC

A quantificação dos compostos analisados, em $mg \cdot L^{-1}$, foi efectuada através da curva de calibração obtida para cada composto.

Para obter estas rectas, prepararam-se cinco soluções destes compostos com concentrações entre $50 mg \cdot L^{-1}$ e $800 mg \cdot L^{-1}$ e, após serem injectados, determinaram-se as áreas correspondentes, recorrendo ao software Varian Star Workstation.

Determinou-se a média das várias razões concentração/área para os dois compostos, o que permitiu determinar o coeficiente de resposta (K), que é obtido pela razão entre a média correspondente à γ -undecalactona e γ -decalactona.

Na Tabela A.1.2 apresenta-se a expressão representativa da recta de calibração para a concentração de γ -decalactona.

Tabela A.1. 2 – Expressão das rectas de calibração do GC, para cada composto analisado.

Composto	Gama de validade ($mg \cdot mL^{-1}$)	Equação	
		$[J] = (m \pm S_m) \times A + (b \pm S_b)$	
		$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$
γ -decalactona	50 - 800	(1.1813 ± 0.08)	(13.829 ± 27.4)
γ -undecalactona	50 - 800	(1.1959 ± 0.02)	(14.757 ± 8.7)

Sendo:

$[J]$, a concentração dos compostos, em $mg \cdot L^{-1}$

A , a área dos picos detectados pelo GC para os vários compostos