



PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE
ASSOCIADA À SUPERFÍCIE CELULAR DE
Yarrowia lipolytica

Caroline Santos Marques Da Silva

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, Dsc

Tamires Carvalho Dos Santos, Dsc

Julho de 2017

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE ASSOCIADA À SUPERFÍCIE CELULAR DE *Yarrowia lipolytica*

Caroline Santos Marques Da Silva

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc.

Emília Akil, D.S.c

Débora França de Andrade, D.Sc.

Orientado por:

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Tamires Carvalho Dos Santos, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Julho de 2017

Aos meus dois fiéis amigos, Rocky e Bruce.

It's what you do in the dark, that puts you in the light"

Under Armor

"Pain is temporary. Quitting lasts forever."

Lance Armstrong

"Hard work beats talent when talent doesn't work hard"

Tim Notke

"If you're going through hell, keep going"

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

Deixo a minha gratidão registrada para:

À minha mãe que sempre acreditou e torceu por mim até o final e aonde ela estiver sei que está orgulhosa do que eu conquistei e do que ainda irei conquistar.

À minha orientadora, Priscilla Amaral pelos ensinamentos, paciência e amizade.

À minha co-orientadora Tamires Carvalho por toda amizade e ensinamentos.

Às minhas amigas, Tati, Tami, Roberta, Fabi, Alanna, Carol, Nanci e Priscila por todo apoio e carinho.

À minha querida equipe de Natação do Olaria Atlético Clube, Rafael Soares, Paty, Ana, Gabi, Dudu, João Victor, Pedro Pimentel, Vitinho, Ryan, André, Letícia, Pedro “maluco”, Lucas, Joaozinho, Pedro Augusto, Babi, Bravim, Thais, vocês foram fundamentais. Em cada treino, era uma lição para vida. Obrigada por terem me ajudado a ser uma pessoa melhor. Vocês sempre serão meus campeões.

Ao LABCOM pela análise das amostras dos produtos de transesterificação e esterificação.

Ao “Seu” Alcir por todas as infinitas xerox e por seus conselhos.

Ao Betão por todos os “cafezinhos” e simpatia .

Resumo do Projeto Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE ASSOCIADA À SUPERFÍCIE
CELULAR DE *Yarrowia lipolytica*.**

Caroline Santos Marques Da Silva

Julho, 2017

Orientadores: Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Tamires Carvalho Dos Santos, D.Sc.

A busca por rotas tecnológicas cada vez mais sustentáveis direciona fortes estudos para o uso de enzimas como catalisadores de diversos processos químicos. Alta atividade catalítica, especificidade pelo substrato, biodegradabilidade e alta atividade em condições brandas de temperatura e pressão. O uso de lipases nos processos industriais tem como seu maior empecilho o custo dos processos de produção e purificação das mesmas. Uma alternativa para contornar o custo das enzimas é a possibilidade de reutiliza-las ao final de cada processo. Para isso, a imobilização das enzimas aparece com a solução para tornar possível o reuso das enzimas. O uso de enzimas aderidas a superfície celular se enquadra em um caso de imobilização de enzimas. Além disso, a presença de um suporte acoplado à enzima facilita a sua purificação impactando na redução do custo da mesma. Dentre as enzimas utilizadas no mercado, as lipases revelam papel de destaque neste cenário. Lipases são produzidas por diversos micro-organismos, bactérias, fungos filamentosos e levedura. Dentro das leveduras, *Yarrowia lipolytica* encontra-se como um promissor micro-organismo produtor de lipase por apresenta três isoformas de lipases, extracelular, intracelular e associada à superfície celular. O presente trabalho foi desenvolvido com intuito de produzir lipase associada à superfície celular de *Yarrowia lipolytica* a partir de cultivos com diferentes óleos vegetais e ácidos graxos, escolhendo o cultivo com a melhor indução de lipase associada ao debri celular. Além disso, foi testado o potencial desta enzima no processo de produção de biodiesel a qual exibiu tempos de reação longo.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO | 1 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 3 |
| 2.1 Lipases | 3 |
| 2.1.1 Caracterização e mecanismo de ação de lipases | 3 |
| 2.1.2 Principais fontes de lipases | 5 |
| 2.1.3 Lipases intracelulares..... | 6 |
| 2.1.4 Aplicações de lipases em processos industriais | 7 |
| 2.2 <i>Yarrowia lipolytica</i> | 8 |
| 2.2.1 Lipases de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 10 |
| 2.2.2 Condições de produção de lipase de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 12 |
| 2.3 Lipases para produção de Biodiesel..... | 12 |
| 3 CAPÍTULO - OBJETIVOS | 15 |
| CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 4.1 Equipamentos..... | 16 |
| 4.2 Micro-organismo..... | 16 |
| 4.2.1 Preservação da cultura | 16 |
| 4.2.2 Obtenção do inóculo | 17 |
| 4.3 Esterilização de meios de cultura e instrumentos | 17 |
| 4.4 Produção de lipases utilizando diferentes fontes de carbono..... | 17 |
| 4.5 Obtenção das frações intracelulares de lipase..... | 19 |
| 4.6 Reação de Transesterificação e Esterificação | 19 |
| 4.6.1 Reação de Transesterificação..... | 19 |
| 4.6.2 Reação de Esterificação | 20 |
| 4.7 Métodos Analíticos | 21 |
| 4.7.1 Quantificação da concentração celular | 21 |
| 4.7.2 Determinação da atividade enzimática | 21 |

| | |
|---|----|
| 4.7.3 Análise do teor de ácidos graxos do óleo de fritura residual | 22 |
| 4.7.4 Análise da conversão do ácidos graxos em ésteres metílicos | 23 |
| CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 5.1 Efeito da fonte de carbono no crescimento celular | 24 |
| 5.2 Efeito da fonte de carbono sobre produção de lipases | 26 |
| 5.3 Potencial de lipase associada nas reações de transesterificação e esterificação | 31 |
| 5.3.1 Enzima e células liofilizadas | 32 |
| 5.3.2 Lipase associada (LA) sem liofilização | 34 |
| CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO | 41 |
| CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 42 |
| CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 – Mecanismo de reação de hidrólise de um éster por lipase | 5 |
| Figura 4.1 Curva de peso seco de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 21 |
| Figura 5.1 – Cinética de Crescimento celular de <i>Yarrowia lipolytica</i> | 24 |
| Figura 5.2 – Atividade hidrolítica de lipases de <i>Y. lipolytica</i> em meio com 1% de ácido oleico | 27 |
| Figura 5.3 — Atividade hidrolítica de lipases de <i>Y. lipolytica</i> em meio com 0.1% de ácido esteárico | 28 |
| Figura 5.4 – Atividade hidrolítica de lipases de <i>Y. lipolytica</i> em meio com 1% de Óleo de Oliva | 29 |
| Figura 5.5 — Atividade hidrolítica de lipases de <i>Y. lipolytica</i> em meio com 1% de Óleo de Fritura Residual | 30 |
| Figura 5.6 –Cromatograma do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (CG=30%) | 32 |
| Figura 5.7 —Cromatograma do produto de transesterificação catalisada pela célula íntegra liofilizada | 33 |
| Figura 5.8 —Cromatograma por HPLC do produto de transesterificação catalisada pela lipase associada à superfície celular (LA) liofilizada..... | 34 |
| Figura 5.9 — Cromatograma do produto de transesterificação da amostra contendo 8,3 g de óleo de soja e 3 g de etanol com 15 mg de enzima (Lipase associada à superfície celular produzida em OFR), ressuspensas em 3 mL de água. | 35 |
| Figura 5.10 —Mecanismo de catálise de lipases | 36 |
| Figura 5.11 — Cromatograma por HPLC do produto de transesterificação da amostra contendo inicialmente 10 mL de óleo de soja e 6 mL de etanol com 16 mg de enzima, ressuspensas em 3 mL de água | 38 |
| Figura 5.12 —Cromatograma por HPLC do produto de transesterificação da amostra contendo inicialmente 10 mL de óleo de soja e 6 mL de etanol com 18 mg de enzima (Lipase associada à superfície celular produzida em OFR), ressuspensas em 3 mL de água. | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 5.1 – Taxa específica de Crescimento e substrato utilizado para o cultivo de <i>Y. lipolytica</i> | 25 |
| Tabela 5.2 – Teor de ácidos graxos dos óleos de oliva e de palma (obtido na literatura) e concentração relativa (%) dos ácidos graxos do óleo de fritura residual obtido por cromatografia gasosa..... | 25 |
| Tabela 5.3 – Atividade máxima, obtida em cada fonte de carbono utilizada, de lipase associada à superfície celular e o respectivo tempo de cultivo | 25 |
| Tabela 5.4 - Produção de biodiesel por catálise de lipases comerciais | 36 |

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Os aspectos abordados no presente trabalho envolvem as novas tendências dos processos industriais, que demonstram maior interesse em rotas com maior apelo sustentável. Em virtude disso, foi estudada uma rota emergente de produção de biodiesel, a rota enzimática.

O desenvolvimento do processo de produção de enzimas, em escala industrial, em qualidade satisfatória e custos que permitam sua comercialização, requer um trabalho laborioso, caro e interdisciplinar. Faz-se necessário o conhecimento técnico-econômico da relação entre as diferentes etapas do processo que vão desde a obtenção da linhagem adequada, definição do melhor processo de produção até a adequação dos métodos de recuperação e/ou purificação e concentração de enzimas. Dependendo da sua aplicação, a enzima pode ser vendida comercialmente em diferentes graus de pureza (VOLPATO, 2009).

A produção de compostos químicos de alto interesse biotecnológico requer, na maioria das vezes, o uso de enzimas como catalisadores. Durante os últimos 20 anos, foi evidenciado um grande crescimento na aplicação industrial destes biocatalisadores. As razões deste crescimento podem ser resumidas em: alta eficiência catalítica, alta especificidade pelo substrato, biodegradabilidade e alta atividade em condições suaves de temperatura e pressão (VOLPATO, 2009)

A utilização de enzimas ocorre em diferentes campos de aplicação, tais como a indústria química, farmacêutica, cosmética ou de alimentos. As pesquisas dos últimos anos levaram a uma melhor compreensão do comportamento catalítico das enzimas e, juntamente com a engenharia molecular, conduziram as novas aplicações de várias enzimas como, por exemplo, proteases, acilases, oxidase, amilases, glicosidases, celulases e lipases (VILLENEUVE, 2007). A maior fatia do mercado industrial de enzimas é ocupada pelas hidrolíticas e, dentro desta, as lipases possuem um grande destaque. A respeito das lipases (E.C.3.1.1.3 triacilglicerol éster hidrolases), as aplicações têm destaque na síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica, como por exemplo o tratamento de efluentes da indústria petrolífera (HASAN et al., 2006; SINGH *et al.*, 2008).

Apesar das lipases termoestáveis serem particularmente usadas na síntese de ésteres e amidas, sendo também empregadas nos processos produtivos de álcoois primários e secundários, bem como, ácidos carboxílicos (MOREAU et al., 2008), elas

também são usadas para nas reações de esterificações, transesterificação, acidólise e aminólise. Essas características abrem margem para a utilização de lipases na produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, que já é produzido em escala industrial, através de catalisadores químicos ácidos ou básicos (MOREAU *et al.*,2008).

Porém, as lipases são enzimas com alto custo, sendo este um aspecto crítico na implementação de processos enzimáticos de síntese orgânica. Ainda, no sentido de diminuir o custo de produção da lipase, a utilização de substratos mais baratos e técnicas simples de purificação, tornam-se fatores de extrema importância para redução do custo final dessas enzimas.

Outro inconveniente que impede o uso massivo de lipases, e enzimas em geral, ao nível industrial, está relacionado com sua forma solúvel. Nesta forma muitas enzimas não são suficientemente estáveis nas condições operacionais, podendo perder sua atividade catalítica devido à auto oxidação, à autodigestão e/ou à desnaturação provocada por solventes, por solutos ou pela agitação mecânica, além do fato, de que quando as enzimas estão solúveis em água, sua separação do meio reacional é difícil e isso impede sua posterior reutilização (VOLPATO., *et al* 2009).

Estes problemas podem ser solucionados por meio de produção de lipases aderidas a superfície celular do micro-organismo. Assim, a enzima encontra-se naturalmente aderida a um suporte. Dentro deste contexto, este trabalho pretende contribuir para o estudo de produção de lipase associada à superfície celular de *Yarrowia lipolytica* utilizando matéria-prima barata e testar seu potencial nas reações para obtenção do biodiesel. O uso de lipases associadas a superfície celular caracteriza-se como um caso de imobilização celular natural, o que contribui para a reutilização da mesma no processo. Tal aspecto contribui para redução do custo final do processo. Além disso, o uso do óleo de fritura residual como matéria – prima para obtenção de lipase contribui para um maior caráter sustentável do processo, pois trata-se do reuso de um rejeito industrial.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipases

2.1.1 Caracterização e mecanismo de ação de lipases

Lipases (triacilglicerol e teracilhidrolases E.C.3.1.1.3) são enzimas extremamente versáteis que apresentam a peculiar característica de serem estáveis em meios orgânicos e aquosos (SHARMAN & KANWAR, 2014).

São enzimas pertencentes ao grupo das esterases e catalisam a hidrólise de ligações éster de triacilgliceróis de cadeias longas de ácidos graxos, formando ácidos graxos livres, glicerol, diacilglicerol e monoacilglicerol. Essas enzimas também são capazes, em condições micro aquosas, de catalisar a síntese de ésteres bem como a transesterificação e desta forma, apresentam grande aplicação industrial, catalisando diferentes reações (PAQUES & MACEDO 2006; SHARMAN & KANWAR, 2014).

A principal fonte de obtenção de lipases, para fim comercial, é a partir de micro-organismos (bactérias, fungos filamentosos, leveduras) por meio de fermentação submersa ou em estado sólido. No caso específico de leveduras, geralmente a produção submersa pode ser utilizada (TREICHEL *et al.*, 2010; ANDUALEMA & GESSESSE, 2012). Devido ao grande número de organismos produtores, existirem vários tipos de lipases com diferentes especificidades quanto ao tipo de substrato e exigências de pH e temperatura (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Lipases apresentam um enorme potencial biotecnológico por várias razões: São estáveis em solvente orgânicos, não necessitam de cofatores, atuam em ampla faixa de pH e temperatura, apresentam elevada enantiosseletividade, possuem alto grau de especificidade e, por isso, suas reações raramente formam produtos laterais ou secundários (BORNSHERUER, 2002; HOFFMAN, 2010; ANDUALEMA & GESSESSE, 2012).

Lipases são definidas a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. A atividade das esterases é em função da concentração do substrato de acordo com o modelo clássico de Michaelis Menten, em meio homogêneo, ou seja, o substrato deve estar solúvel no meio reacional. Porém, atividade lipásica aumenta quando há formação de interfaces, e este fenômeno chama-se ativação interfacial e, desta forma, a cinética de reações com

lipases não pode ser descrita pelas equações de Michaelis Menten (JAEGER & REETZ,1998).

Muitas lipases apresentam seu sítio catalítico coberto por uma estrutura formada por uma ou mais tampas. Esta região é um elemento chave na atividade e especificidade de lipases é composta de uma α -hélice e dois segmentos em dobradiça em lipases fúngicas. Na forma inativa, esta estrutura encontra-se fechada, cobrindo o sítio catalítico da enzima. Na forma ativa, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo deixando-o totalmente acessível ao substrato. Nesse movimento, o lado hidrofóbico fica totalmente exposto, expandido consideravelmente a superfície não polar do sítio ativo (COSTA & AMORIM, 1999; BORDES *et al.*, 2010).

O mecanismo de ativação interfacial pode variar significativamente de acordo com a estrutura e origem da lipase (DEREWENDA,1994; THUREN, 1988; BORDES *et al.*, 2010). Foram descritos dois mecanismos diferentes de ativação:

- Ativação interfacial envolvendo a mudança conformacional por envolver adsorção da enzima à interface do lipídio

- Mecanismo de ativação em 2 passos: o primeiro envolve a adsorção da enzima na interface do lipídio e o segundo é a formação de um complexo enzima/substrato;

Algumas lipases, apesar de possuírem a tampa, não apresentam a sua atividade relacionada com a atividade interfacial, como por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica*, que apresentam a tampa em suas estruturas, mas não sofrem ativação interfacial (FERRATO *et al.*, 1997).

O mecanismo para a formação de ésteres e para a hidrólise é o mesmo tanto para esterases, quanto para lipases e ocorre em quatro etapas (Figura1): O substrato é ligado à serina ativa, obtendo-se um intermediário tetraédrico estabilizado pelos resíduos de asparagina e histidina. Em seguida, o álcool é libertado e um complexo acil/enzima é formado. Então, ocorre o ataque de um nucleófilo (água, na hidrólise; álcool ou éster, na transesterificação), formando novamente um intermediário tetraédrico, o qual libera o produto (ácido ou éster e a enzima livre (BORNSCHEUER *et al.*, 2002).

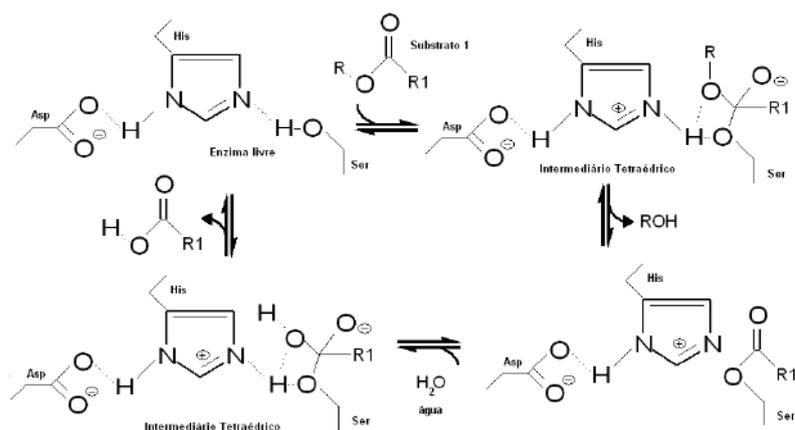


Figura 2.1- Mecanismo de reação de hidrólise de um éster por lipase. (HAEFFNER e NORIN, 1999)

2.1.2 Principais fontes de lipases

As lipases podem ser encontradas em animais (pâncreas, plasma de sangue, saliva, suco pancreático), no leite, em vegetais (soja, amendoim, etc.), bactérias e fungos (WHITAKER, 1972). Nos eucariotos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo lipídico, incluindo a digestão de gorduras, o metabolismo de lipoproteínas, absorção e reconstituição. Nas plantas, as lipases são encontradas nos tecidos de reserva de gordura (SHARMA, *et al.*, 2001).

Das fontes produtoras de lipases, as microbianas são as de maior interesse industrial por vários motivos, entre eles, a grande variedade de microrganismos produtores. Existem inclusive algumas lipases de origem microbiana que já são disponíveis comercialmente, como a lipase de *Candida rugosa* (JAEGER E REETAZ, 1998).

Os micro-organismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos *habitats*, como em resíduos industriais, em fábricas que processam óleos vegetais, em indústrias de laticínios, em solos contaminados com óleo, em sementes que produzem óleo, em pilhas de compostagem, em alimentos em deterioração, entre outros (SZTAJER *et al.*, 1988; SHARMA *et al.*, 2001). Entre os micro-organismos produtores estão as bactérias (JAEGER *et al.*, 1999), os fungos filamentosos (ELIBOL e OZER, 2002), as leveduras (MURALIDHAR *et al.*, 2001) e os actinomicetos (SZTAJER *et al.*, 1988).

Entre os micro-organismos, as leveduras apresentam uma série de vantagens frente às outras fontes microbianas, como, por exemplo, menor tempo de geração do que os fungos filamentosos e melhor adaptação a longos tempos de processo. Além disso, são geneticamente mais estáveis do que as bactérias e possuem “GRAS status”

(*Generally Regarded As Safe*), o que permite que os produtos obtidos por estes microrganismos sejam mais aceitos nos setores alimentício e farmacêutico (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

2.1.3 Lipases intracelulares

São conhecidas três frações de lipases produzidas por micro-organismos: a intracelular, a ligada à membrana celular e a extracelular (PEREIRA-MEIRELLES, 1997).

As lipases extracelulares são as mais comumente estudadas e aplicadas, mas apresentam na sua produção as etapas de separação e purificação que encarecem a sua utilização (BAN *et al.*, 2002). Desta forma, as lipases intracelulares vêm despertando o interesse pelo seu potencial de uso em biotecnologia, e, portanto, já existem pesquisas para a produção de lipases intracelulares com alta atividade lipolítica e sua aplicação em reações de esterificação e transesterificação (SILVA *et al.*, 2009). Alguns trabalhos descrevem a produção de lipase intracelular ou ligada à célula a partir de leveduras como *Yarrowia lipolytica* e *Pichia pastoris* (JIANG *et al.*, 2007; OTA *et al.*, 1982; PEREIRA-MEIRELLES, 1997), de fungos filamentosos como *Rhizopus chinensis*, *Rhizopus oryzae* (NAKASHIMA *et al.*, 1999; MATSUMOTO *et al.*, 2002; MONTEIRO *et al.*, 2010), *Rhizopus oligosporus* (IFTIKHAR *et al.*, 2008) e *Mortierella alliacea* e *Mucor circinelloides* (JERMSUNTIEA *et al.*, 2011; SZCZĘSNA-ANTCZAK *et al.*, 2006). Alguns autores relatam que a viabilidade econômica do processo encontra-se na imobilização dessas células íntegras, ou seja, a imobilização do micélio/células contendo a lipase intracelular ou ligada em um suporte que seja estável, inerte e que possua boa aderência ao micro-organismo (SILVA *et al.*, 2009).

WATANABE *et al.* (1977) isolaram duas cepas de *P. nitroreducens* capazes de produzir lipases extracelulares e lipases que permanecem ligadas à célula. Células de *Yarrowia lipolytica* também apresentam lipases extracelulares e outras duas ligadas à célula (OTA *et al.*, 1982). Estas moléculas requerem ativadores que podem, inclusive, ser produzidos pelo próprio micro-organismo. PEREIRA-MEIRELLES *et al.* (2000) estudaram a localização da lipase em células de *Yarrowia lipolytica* e não detectaram lipase extracelular durante as primeiras 24 horas de cultivo, sugerindo que nesta fase a lipase intracelular (Frações L ligada à célula e I intracelular) começa a ser liberada

lentamente no meio de cultura e atinge seu máximo somente no final da fase estacionária de crescimento.

Nunes (2011) estudou a indução de frações de lipases intracelulares de lipase de *Y.lipolytica* por óleo de fritura residual (OFR) e constatou que a enzima apresentou valores menores de atividades hidrolíticas máximas que os obtidos com o azeite de oliva. Além disso, houve na presença de OFR uma baixa detecção de atividade extracelular, o que pode ser devido a presença de componentes no OFR que possam inibir a produção de lipase extracelular.

2.1.4 Aplicações de lipases em processos industriais

As lipases são as enzimas mais utilizadas em síntese orgânica e mais de 20% das biotransformações são realizadas utilizando-as (JAYAPRAKASH e EBENEZER, 2010). Estão na terceira posição em vendas, perdendo para proteases e amilases (RIGO et al., 2010).

Na indústria de alimentos, as lipases são utilizadas principalmente para a obtenção de ácidos graxos insaturados, os quais promovem aroma e sabor, sendo aditivos com importante função nas características organolépticas do produto e na sua digestibilidade. São utilizadas também na maturação de queijos e modificação de manteigas, com diminuição do seu teor calórico. Na panificação, aumentam o tempo de prateleira dos produtos. As lipases podem também ser usadas para melhorar o aroma de bebidas e na retirada de gorduras de produtos a base carne e peixe (SHARMA *et al.*, 2001; COELHO & SALGADO., 2008; SHARMAN & KANWAR, 2014).

Na indústria de detergentes, as lipases são utilizadas, juntamente com proteases, amilases e celulasas, na formulação de produtos de limpeza, para a remoção de manchas de gordura e sujeira de utensílios domésticos) A primeira lipase produzida para esse fim, a LIPOLASE (Novo Nordisk®), foi lançada no mercado em 1988 e incorporada em detergentes de diferentes marcas. Esta enzima foi produzida através de engenharia genética e possui a capacidade de remover diferentes tipos de manchas (batom, gorduras, manteiga, azeite, molhos, etc.) (COELHO & SALGADO, 2008; HASAN *et al.*, 2010).

A utilização de lipases na indústria farmacêutica deve-se principalmente à enantiosseletividade exibida por estas enzimas. A resolução de misturas racêmicas permite a obtenção de produtos opticamente puros, o que é extremamente vantajoso já

que, em muitos casos, normalmente apenas um dos enantiômeros apresenta atividade terapêutica (MANOEL *et al.*, 2012).

Na indústria cosmética, estas enzimas são usadas na síntese de matérias-primas e como ingredientes ativos nas formulações cosméticas. Um exemplo são os retinóicos, eles são importantes agentes anti-acne utilizados em cosméticos. Os derivados hidrossolúveis da vitamina A podem ser obtidos através de catálise com lipases imobilizadas. Além disso, as lipases, por realizarem hidrólise de triacilgliceróis, são utilizadas no tratamento da pele e cabelos oleosos, fazendo parte da formulação de produtos como géis e xampus, assim como ativos que auxiliam no tratamento de celulite, através da lipólise dos adipócitos (MAUGARD *et al.*, 2002; SHARMAN & KANWAR, 2014).

Na área ambiental, as lipases podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais e na remoção de óleos que poluem solos e água. Além disso, também podem ser úteis na remoção de depósitos de gorduras que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas e alimentos líquidos. A aplicação de micro-organismos produtores de lipases na degradação de hidrocarbonetos derivados do petróleo é sugerida como uma alternativa de biorremediação (HASAN *et al.*, 2006);

As lipases apresentam uma enorme utilização na indústria oleoquímica. Quando usadas como biocatalisadores proporcionam a diminuição dos gastos com energia e menor degradação dos produtos. Estas enzimas também são utilizadas na modificação de óleos e gorduras como, por exemplo, a síntese de ácidos graxos insaturados para a indústria de alimentos (NUNES, 2015). Além disso, podem promover a síntese de ésteres com o mínimo de reações secundárias, resultando na formação de menos subprodutos (COELHO & SALGADO, 2008).

Apesar da grande versatilidade dessas enzimas, seu uso industrial ainda é limitado pelo seu elevado valor comercial, especialmente quando grande quantidade de enzima é necessária ou quando o produto final do processo tem baixo valor agregado (RIBEIRO *et al.*, 2011).

2.2 *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é um micro-organismo estritamente aeróbico, eucariótico, do reino Fungi, pertence à classe dos Ascomicetos e subclasse Hemiascomicetos. Foi originalmente classificada como *Candida lipolytica* e depois reclassificada como

Endomycopsis lipolytica, *Saccharomyces lipolytica* e, finalmente, *Yarrowia lipolytica* (Barth, 1997). É geralmente isolada, principalmente, de meios contendo fonte de carbono lipídica, tais como ambientes poluídos, como a Baía de Guanabara (HAEGLES, 2001).

Essa levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (consideradas leveduras “convencionais”) em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Essa levedura apresenta GRAS Status, logo não é patogênica, que proporciona sua aplicação na indústria alimentícia, como por exemplo, no desenvolvimento de *flavour* de pêssego e ácido cítrico (TSUGAWA *et al*, 1986). Porém sua principal aplicação é na produção de diversas enzimas, como proteases, esterases, fosfatases e, principalmente, lipases, todas de elevado interesse biotecnológico (NICAUD *et al*, 2002; BRÍGIDA *et al*, 2014b).

Amaral *et al.* (2006) realizaram a caracterização da superfície celular desta levedura e observaram que *Y.lipolytica* IMUFRJ 50682 apresenta alta afinidade por moléculas, líquidos e superfícies hidrofóbicas quando imersas em água. A sua superfície é anfifílica, apresentando alta atração por substrato hidrofóbicos e a interação entra as células e estes compostos é realizado por proteínas ou glicoproteínas presentes na parede celular. Além disso, esta levedura secreta um surfactante que facilita a interação superfície celular/superfície hidrofóbica .

Além disso, *Y. lipolytica* é amplamente utilizada em processos de biorremediação devido às suas características metabólicas específicas e à sua superfície celular hidrofílica, o que permite excelente degradação de compostos hidrofóbicos (MOFTAH *et al.*, 2013).

Quando substratos hidrofóbicos são utilizados, acredita-se que estes se encontram dispersos no meio, sob a forma de gotas e os micro-organismos possuem mecanismos para facilitar o acesso a ele (AMARAL *et al.*, 2006). A assimilação de substratos hidrofóbicos pode ocorrer através de adsorção direta das gotas hidrofóbicas à superfície celular ou pode ser mediada por um surfactante O micro-organismo tem acesso à maior parte do substrato através de contato (ERICKSON & NAKAHARA, 1975).

Yarrowia lipolytica é capaz de produzir biosurfactante em diferentes fontes de carbono (hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de algodão), porém não produz em substratos solúveis como glicose, glicerol e álcool (CIRIGLIANO & CARMAM, 1984; ZINJARDE & PANT 2002). Amaral *et al.* (2007) relataram a produção de um bioemulsionante, chamado Yansan, pela levedura *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 utilizando meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono e PFC (perfluorocarboneto. Yansan é um complexo lipídico-carboidrato-proteico, possui alta atividade emulsificante e estabilidade em ampla faixa de pH (3-9). Além disso, forma emulsões com hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos e perfluorocarbonetos.

Yarrowia lipolytica apresenta a capacidade de gerar produtos de alto valor como lipases e ácido cítrico, inclusive quando cultivada em substratos residuais (NUNES,2015). Moftah *et al.* (2013) relataram que os resíduos do processamento de azeite de oliva fornecem os nutrientes necessários para o crescimento e a produção de lipases por esta levedura, o que leva a uma valorização deste resíduo.

2.2.1 Lipases de *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia lipolytica é capaz de produzir lipases intracelulares, ligadas à célula e extracelulares e sua produção é muito influenciada por fatores nutricionais e físico-químicos como temperatura, pH, fonte de nitrogênio e carbono, presença de lipídios e de biosurfactantes, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido (PEREIRA-MEIRELLES, 1997; CORZO & REVAH, 1999; AMARAL, 2007).

Yarrowia lipolytica secreta várias isoformas de lipases, com massa molecular variando de 38,5 a 44 kDa. Estudos genômicos sugerem que esta levedura apresenta 25 supostas lipases, produzidas por seis diferentes cromossomos (A-F) (FICKERS *et al.*, 2005a; LIU *et al.*, 2010; NAJJAR *et al.*, 2011; FICKERS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; KUMARI & GUPTA, 2012). Cada isoforma tem diferentes propriedades, principalmente em relação às características de especificidade e preferência por substratos (RIBEIRO *et al.*, 2011). A lipase Lip2 de *Y. lipolytica* é produzida em grandes quantidades na presença de ácido oleico, que funciona como um fator chave para a ativação do gene lip2 e indução de sua produção.

A variável mais estudada e que sempre impactou a produção de lipases é a fonte de carbono, uma vez que as lipases são facilmente induzidas por lipídios, como óleo ou qualquer outro indutor da mesma natureza (NUNES, 2015). Porém, alguns autores vêm

apresentando em seus trabalhos, na ausência de gorduras ou óleos, expressiva síntese de lipases por esta levedura (AMARAL *et al* 2006).

Lipases extra e intracelulares apresentam atividades diferentes. Ota *et al.* (1970) relataram que a lipase extracelular precisa de um ativador para a hidrólise de triglicerídeos, enquanto que a lipase ligada à superfície celular não, exibindo, desta forma, propriedades diferentes da extracelular. Ota *et al.* (1982), identificaram que a levedura *Saccharomyopsis lipolytica* (hoje, chamada *Y. lipolytica*) é capaz de produzir dois tipos diferentes de lipases ligada à célula: lipase I (39 KDa) e lipase II (44KDa), as quais apresentaram propriedades muito similares e estas lipases foram até 3 vezes mais ativas que a lipase extracelular produzida pela mesma levedura, nas mesmas condições. Em 1986, Gomi e colaboradores concluíram que as lipases de *Y. lipolytica* necessitam de um cofator produzido pela levedura e íons cálcio para manter sua atividade catalítica.

A produção das diferentes frações de lipase depende da fase de crescimento em que as células se encontram. A fração de lipase extracelular não é detectada durante as primeiras 24 horas de cultivo de células de *Y. lipolytica* (OTA *et al.*, 1970; PEREIRA-MEIRELLES, 1997). Através de análises por *Western Blotting* em membrana de nitrocelulose, usando anticorpos policlonais anti-YLLIP2, a lipase Lip2 foi detectada na superfície celular de *Y. lipolytica* durante a fase exponencial e é liberada para o meio de cultura durante a fase estacionária, quando a concentração de substrato diminui (FICKERS *et al.*, 2004).

As lipases Lip7p e Lip8p diferem entre si e da lipase Lip2 por apresentarem especificidade por substratos diferentes. Lip2p é a responsável pela maior parte da atividade extracelular detectada nos cultivos com *Y. lipolytica* e apresenta grande afinidade por substratos com cadeias longas de carbono (PIGNEDE *et al.*, 2000; FICKERS *et al.*, 2004). Lip7p e Lip8p estão principalmente associadas ou retidas na célula durante a fase exponencial e a fase estacionária de crescimento e podem corresponder às lipases descritas por Ota *et al.* (1982) (FICKERS *et al.*, 2005a). Apresentam maior termoestabilidade que a Lip2p e apresentam especificidade por cadeias curtas (C6) e médias (C10), respectivamente (FICKERS *et al.*, 2005a; LIU *et al.*, 2010). Kumari & Gupta (2012) relataram alta atividade de Lip8 também com substratos oleosos ricos em ácido oleico (C18). Vários trabalhos realizaram o estudo de lip7 e lip8 através da sua ancoragem na superfície celular de micro-organismos ou através de clonagem e expressão extracelular destas lipases (NUNES, 2015). Essas enzimas apresentam diferenças significativas em sua atividade e características de

acordo com o tipo de célula em que são expressas ou com o sistema de ancoragem utilizado (LIU *et al.*, 2010).

2.2.2 Condições de produção de lipase de *Yarrowia lipolytica*

A produção de lipases depende da fonte de carbono e de nitrogênio e cada cepa produtora apresenta uma resposta diferente à composição dos meios de cultura (NUNES, 2015).

Peptona, extrato de lêvedo, caseína e triptona têm sido relatadas como excelentes fontes de nitrogênio para a produção de lipases. Surfactantes como o Tween 80 geralmente podem ser usados para aumentar a liberação de lipases associadas à parede celular e para algumas cepas também funciona como indutor da produção de lipases (DALMAU *et al.*, 2000; BRÍGIDA *et al.*, 2014).

A produção de lipases é intensa na presença de substratos hidrofóbicos, como óleos, ácidos graxos e metil ésteres (BRÍGIDA *et al.*, 2014). Ácidos graxos de 16 a 22 carbonos, geralmente presentes em óleos vegetais (oliva, soja, girassol, gergelim, semente de algodão, milho e amendoim) são excelentes indutores da produção destas enzimas (NUNES, 2015). Esses óleos possuem, em sua constituição, ácido oleico e linoleico, que, quando usados como fonte de carbono, resultam, geralmente, em altos níveis de atividade lipásica (SHARMA *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2003; BURKERT *et al.*, 2004).

Normalmente a atividade de lipases intra e extracelulares aumenta com o aumento da concentração de lipídeos fornecidos, porém níveis excessivos de lipídeos podem ser tóxicos para as células (ZAREVÚCKA, 2012). Os óleos vegetais são considerados matérias-primas que permitem uma redução dos custos para a produção de lipase em escala industrial (ANDUALEMA *et al.*, 2012). As gorduras animais, ao contrário dos óleos vegetais, podem não favorecer a produção de lipases (TAN *et al.*, 2003).

Segundo NUNES (2015) óleo de fritura residual é capaz de induzir a produção de lipases intracelulares por *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 na ausência de outras fontes de carbono. Sendo, uma alternativa para reduzir o custo final das enzimas.

2.3 Lipases para produção de Biodiesel

O biodiesel é um combustível renovável, produzido a partir de óleo vegetal ou gordura animal, que pode funcionar como um substituto para o diesel. O uso de óleos

vegetais para a sua produção traz várias vantagens, pois acarreta a substituição de combustíveis fósseis por fontes alternativas e renováveis de energia e não contribui para a emissão de gases.

A transesterificação por catálise homogênea alcalina é a via mais empregada industrialmente. Essa preferência frente a catálise ácida deve-se ao menor tempo de reação requerido, menor temperatura reacional e menores razões molares entre o álcool e o óleo (FREEDMAN e BUTTERFIELD; PRYDE, 1986; FREEDMAN, PRYDE e MOUNTS, 1984). Um grande problema dessa rota é o elevado risco de saponificação, ou seja, formação de sabão através da reação entre o catalisador e os ácidos graxos livres, promovida pela presença de água. Além de se perder eficiência na formação de produtos, a separação pode ser dificultada pela formação de emulsões.

O uso de lipases como catalisadores das reações de transesterificação e esterificação surge como tecnologia emergente de produção de biodiesel, pois permite elevados teores de ácidos graxos livres e água na matéria-prima. Além disso, opera em condições brandas de temperatura e pressão, demandando menos energia e oferecendo menor risco a segurança dos trabalhadores. Outra vantagem é o glicerol obtido apresenta maior grau de pureza. O glicerol puro pode ser aplicado na indústria de cosméticos, farmacêutica, detergentes, na fabricação de resinas e aditivos e também na indústria de alimentos. No entanto, os tempos de reação podem variar, mas a princípio são bastantes elevados. Além disso, o preço dessas enzimas ainda é muito alto, o que dificulta a sua implementação no nível industrial (LEE, LIÃO & SHIELD, 2003; MA & HANNA, 1999).

Uma alternativa para contornar o custo das enzimas é possibilidade de reutilizá-las ao final do processo. O uso de enzimas imobilizadas torna viável o reuso das enzimas para este fim, o que pode ser uma potencial solução para reduzir o custo final das enzimas. Neste trabalho buscou-se utilizar lipases associadas à superfície celular o que se enquadra como uma caso de imobilização de enzimas natural, ou seja, feita pelo próprio mecanismo celular.

A síntese enzimática de biodiesel costuma ocorrer a temperaturas entre 25 – 60 °C. Como qualquer proteína, as lipases são suscetíveis a desnaturação e temperaturas acima dessa faixa poderiam tornar a reação inviável. A atividade catalítica das lipases também é afetada pelo tipo e quantidade de álcool utilizado, pelo teor de água no óleo, pela presença de glicerol ou de solventes orgânicos e pela velocidade e tipo de agitação (ANTCZAK *et al.*, 2009).

Segundo Young (2015) em sua revisão bibliográfica, o excesso de álcool no meio reacional pode gerar uma barreira hidrofílica em torno da estrutura enzimática, impedindo o acesso dos substratos hidrofóbicos ao sítio ativo. Além disso, alguns autores afirmam que a suscetibilidade da enzima à desativação é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia do álcool utilizado.

Estudos revelaram que a atividade das lipases diminui na ausência de água. Isso suporta a teoria de que uma quantidade mínima de água é necessária para a ativação da enzima. O aumento do teor de água até certo patamar gera um aumento da produção de etil-ésteres, refletindo um aumento da atividade enzimática. A partir deste patamar, a atividade das lipases diminui gradativamente com o aumento do teor de água. O excesso de água estimula a competição entre a transesterificação e a hidrólise dos triglicerídeos. O patamar pode variar, dependendo da origem da enzima.

3 CAPÍTULO - OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a produção de lipase associada à superfície celular de *Yarrowia lipolytica* por meio de diferentes fontes lipídicas: óleo de fritura residual, ácido oleico , ácido esteárico e óleo de oliva. Em seguida, testar seu potencial nas reações de produção de biodiesel .

Para isso foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Produzir todas as isoformas de lipases em diferentes fontes de carbono: Óleo de oliva, óleo de fritura residual, ácido oleico e ácido esteárico.
- Selecionar a fonte de carbono com melhor indução de lipase associada à superfície celular.
- Testar o potencial desta lipase nas reações de esterificação e transesterificação.

CAPÍTULO 4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nos experimentos e análises foram:

- 1) Centrífuga Eppendorf 5810R;
- 2) Centrífuga Fanem modelo 2014-NR;
- 3) Espectrofotômetro SP 2000 UV;
- 4) Espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1800
- 5) Capela de fluxo laminar BioFlux II 90^a;
- 6) Incubadora com agitação (shaker) Tecnal TE-420;
- 7) Autoclave vertical Primatec modelo CS;
- 8) Balança Shimadzu ATX224;
- 9) Sonicador Ultrasonic Cleaner;
- 10) Banho Termostático BM 60 Temp Therm;
- 11) HPLC (High Pressure Liquid Chromatography), Thermo Scientific Ultimate 3000;
- 12) CG (Cromatógrafo Gasoso) Shimadzu GCMS-QP2010;
- 13) pHmetro de bancada digital Digimed, modelo DM-22;
- 14) Liofilizador Terroni Enterprise I;

4.2 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no presente trabalho é uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 selecionada de um estuário no Rio de Janeiro, Brasil (HAEGLER e MENDONÇA-HAEGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

4.2.1 Preservação da cultura

As células foram conservadas por repiques regulares em tubo de ensaio com meio YPD (“*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e solidificado com ágar 3%. Após incubação a 28 °C (BARTH e GAILLARDIN, 1997) por 48 horas na estufa, as culturas são refrigeradas a 4 °C.

4.2.2 Obtenção do inóculo

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 4.3.1) inoculou-se, de forma estéril com uma alça de platina, em 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL o qual foi incubado em um agitador rotatório a 28°C, 160 rpm de agitação por 72 h. Após este período, a absorvância (570 nm) de uma amostra desse cultivo foi determinada e, em seguida, as células foram centrifugadas de forma estéril a 1258 g por 5 minutos e ressuspensas, servindo de inóculo dos experimentos que serão descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse inóculo é suficiente para obter-se a concentração inicial de células desejada em mg p.s.cel/mL nos meios de cultivo (NUNES, 2015).

4.3 Esterilização de meios de cultura e instrumentos

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 0,5 atm por 20 minutos. As pipetas, os tubos de centrífuga e outros instrumentos utilizados no manuseio do meio de cultivo foram esterilizados em autoclave a 1 atm por 20 minutos (NUNES, 2015).

4.4 Produção de lipases utilizando diferentes fontes de carbono

Com base nos resultados obtidos por Pereira-Meirelles *et al.* (1997) e Nunes *et al.* (2015), foram selecionados azeite de oliva e óleo de fritura residual para realizar os testes iniciais de produção de lipase intracelular. Posteriormente, outros ensaios foram realizados utilizando ácido oleico e ácido esteárico como substitutos aos substratos iniciais. na indução da produção de lipases intracelulares por *Yarrowia lipolytica*. Os experimentos foram realizados em shaker, utilizando os seguintes meios de cultura preparados com água destilada:

- **Meio OO** (Óleo de Oliva), constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo óleo de oliva. Para adicionar estes componentes oleosos ao meio de cultura para o cultivo em erlenmeyer foi utilizado a metodologia desenvolvida por NUNES (2015). Foi preparada uma emulsão a 20 % (5 mL de azeite de oliva; 20 mL de água destilada estéril e 125 µL de antifoam). Esta emulsão foi submetida a

vórtex por 10 segundos e sonicada por 60 segundos a 80% de potência acústica, em sonicador com potência nominal máxima de 130 W. Em seguida, 10 mL da emulsão foi adicionado a 190mL de meio de cultura.

- **Meio OFR** (Óleo de Fritura Residual, obtido, segundo o gerente de *supply chain* da *Brazil Fast Food Corporation*, do processo de fritura de batatas e composto por gordura de palma.) constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo óleo de fritura residual conforme a metodologia descrita para o Meio OO substituindo o óleo de oliva pelo óleo de fritura residual.
- **Meio AcO** (Ácido Oleico), constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo ácido oleico conforme a metodologia descrita para o Meio OO substituindo o óleo de oliva pelo ácido oleico.
- **Meio AcE** (Ácido esteárico), constituído por peptona 6,4 g/L; extrato de lêvedo 10 g/L e emulsão contendo ácido esteárico preparado da seguinte forma: De todas as fontes de carbono utilizadas o ácido esteárico é a única que se encontra em estado sólido a temperatura ambiente. Por isso, preparou-se uma solução de ácido esteárico com concentração de 0,015 mg/mL utilizando o DMSO (Dimetil Sufóxido de Sódio) como solvente. Dessa solução , retirou-se um alíquota de 5 mL para o preparo da emulsão contendo 20 mL de água e 125 µL de antifoam. Esta emulsão foi submetida a vórtex por 10 segundos e sonicada por 60 segundos a 80% de potência acústica, em sonicador com potência nominal máxima de 130 W. Em seguida, 10 mL da emulsão foi adicionado a 190 mL de meio de cultura.

Estes experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 1 litro contendo 200 mL de meio de cultivo, inoculados com células cultivadas em meio YPD, como descrito no item 4.2.2, em quantidade suficiente para obter uma concentração celular inicial de, aproximadamente, 1,0 mg de peso seco de células (p.s. cel)/ mL. Esses meios de cultivo foram incubados em *shaker* a 250 rpm, 28°C por até 85 horas com amostragens em 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 61 e 85 h para o óleo de fritura residual e para o óleo de oliva, para o ácido oleico e ácido esteárico a produção foi acompanhada durante 42h com amostragens em 3, 6, 9, 15, 24, 30, 38, 42 h.

De forma a identificar a influência dos indutores na produção de lipase associada a superfície celular, as atividades enzimáticas (intracelular, extracelular e associada a célula) foram monitoradas durante o processo por meio das metodologias descritas no item 4.7.

4.5 Obtenção das frações intracelulares de lipase

Extração das frações enzimáticas por ultrassom

A metodologia de extração da enzima utilizando ultrassom foi elaborada por Nunes (2015) com base nos resultados obtidos por Kapturowska *et al.* (2012). Coletou-se 20 mL do cultivo em tubo falcon. Em seguida, centrifuga-se a amostra a 4 °C, 4630 g por 5 minutos. O sobrenadante (que corresponde à fração de Lipase Extracelular - LE) é separado e congelado. A seguir, as células (sedimento obtido) são lavadas com água destilada e depois com tampão MOPS pH 7,0 e centrifugadas nas mesmas condições.

Ao final da lavagem, as células são ressuspensas em 20 mL de tampão MOPS e levadas ao sonicador Unique (potência máxima de 500 W, micro ponta de titânio de 4 mm) e, em banho de gelo, inicia-se o processo de sonicação das células nas seguintes condições: 2 ciclos de extração, potência de 150 W, por 9 minutos.

Ao final dos 2 ciclos de sonicação, realiza-se centrifugação a 4°C, 4630 g por 5 minutos. Desta forma, obtém-se o sobrenadante (Lipase Livre intracelular - LL) e o sedimento foi ressuspendido em 20 mL de tampão MOPS pH 7,0 o qual corresponde à fração de LA (Lipase Associada à célula). As frações obtidas são congeladas até a determinação da atividade da enzima (NUNES *et al.*, 2015).

4.6 Reação de Transesterificação e Esterificação

A partir do indutor que produziu a lipase associada à superfície celular com maior atividade hidrolítica, avaliou-se o potencial da mesma para reações de esterificação e transesterificação com intuito de verificar o potencial desta enzima para produção de biodiesel.

4.6.1 Reação de Transesterificação

Para as reações de transesterificação cultivou-se as células de *Y. lipolytica* em meio OFR nas condições descritas no item 4.4 e o cultivo foi interrompido em 6 h.a)
Enzimas e células liofilizadas

Após 6 h de cultivo, todo conteúdo do Erlenmeyer foi coletado (200 mL). Metade do conteúdo foi utilizado para a extração da enzima associada à superfície celular (LA) conforme a metodologia descrita no item 4.5. O restante foi utilizado para obtenção das células centrifugando o conteúdo conforme a metodologia do item 4.5. Como as células apresentam lipase associada à superfície celular, verificou-se a possibilidade de usar as células sem nenhum tratamento de ultrassom para se comparar com a LA.

Enzima (LA) e células (contendo enzima) foram incubadas em ultra-freezer por 3 dias. Em seguida, foram liofilizadas

As células e enzimas liofilizadas tiveram sua atividade determinadas segundo a metodologia descrita no item 4.7.2.

Em seguida, 0,12 g da enzima liofilizada foram adicionadas a 8 g de óleo de soja e 3 g de etanol em frasco de 50 mL. Além disso, 0,12 g de células liofilizadas foram adicionada à 8 g de óleo de soja e 3 g de etanol em frasco de 50 mL. Os dois frascos foram incubados em shaker durante 72 h.

b) Enzima não liofilizada

Para esses experimentos o uso da liofilização não ocorreu.

A LA foi obtida por extração das células cultivadas em OFR em ultrassom conforme descrito no item 4.5. Em seguida, 15 mg de LA foram ressuspensas em 3 mL de água para em seguida serem adicionadas a mistura de 8,3 g de óleo de soja e 3 g de etanol em frasco de 50 mL. A mistura foi incubada em *shaker* durante 72 h.

Outro experimento foi realizado com 16 mg de LA ressuspensas em 3 mL de água e adicionados a 10 mL de óleo de soja com 6 mL de etanol em frasco de 50 mL. A mistura foi incubada em *shaker* durante 2 semanas.

4.6.2 Reação de Esterificação

A partir do cultivo de *Y. lipolytica* com OFR, as células foram coletadas ao final de 6 h de cultivo. A LA foi extraída conforme descrito no item 4.5. Em seguida, 18 mg de LA ressuspensas em 3 mL de água foram adicionados a 10 mL de ácido oleico com 6 mL de etanol em frasco de 50 mL. A mistura foi incubada em *shaker* durante 120 horas.

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Quantificação da concentração celular

A concentração celular foi acompanhada por medidas de densidade óptica a 570 nm e esses valores convertidos para mg p.s. cél/mL, usando-se um fator de conversão previamente determinado em curva de peso seco. A curva de peso seco foi obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, retirou-se uma amostra (10 mL), que foi filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 μ m), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram feitas diferentes diluições de modo a se obter concentrações celulares distintas. Em seguida, mediu-se o valor de absorbância em espectrofotômetro para cada concentração (NUNES, 2015). Esses valores foram colocados em um gráfico para obtenção da curva de peso seco, conforme é apresentado na Figura 4.1.

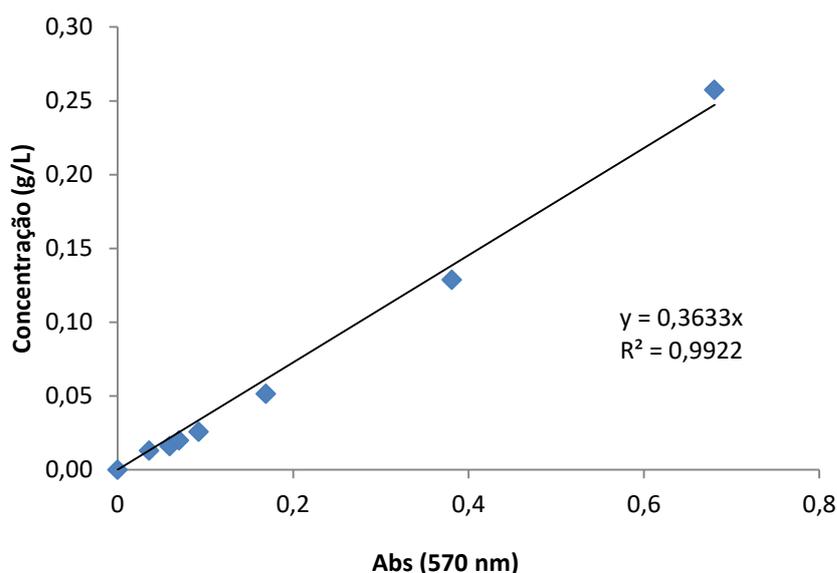


Figura 4.1-Curva de peso seco de *Y. lipolytica*

4.7.2 Determinação da atividade enzimática

4.7.2.1 Atividade enzimática pelo método espectrofotométrico

A atividade hidrolítica foi determinada mediante a variação de absorbância a 410 nm em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1800) devido à oxidação do p-nitrofenil laurato (p-NFL) a uma concentração de 560 μ M, em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 7,0 (BRÍGIDA, 2010). O substrato (p-NFL) foi preparado

solubilizando 0,018 g deste em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) ou álcool isopropílico e, em seguida, diluído em tampão fosfato de potássio (50 mM).

Para determinar as atividades das 3 frações LE, LL e LA um tubo de ensaio contendo 1,97 mL do substrato previamente preparado foi aclimatado a 37 °C por 15 minutos. Após esse tempo, adiciona-se 0,03 mL da fração enzimática a ser analisada e a absorbância foi acompanhada em espectrofotômetro a 410 nm contra o branco de reação (0,2 mL do tampão fosfato de potássio, adicionados a 1,8 mL do substrato), por 100 segundos (AMARAL *et al.*, 2006).

4.7.3 Análise do teor de ácidos graxos do óleo de fritura residual

4.7.3.1 Metilação dos Ácidos Graxos Livres para Análise por Cromatografia Gasosa

As amostras foram descongeladas em banho maria a 37 °C e homogeneizadas. Oito microlitros das amostras oleosas ou 100-200 mg de sílica, proveniente da raspagem na CCD da banda referente ao triacilglicerol, foram transferidas para tubos de hidrólise, nos quais foram adicionados 3,0 mL da solução de metanol:hexano (4:1 v/v) e em seguida 300 µL de cloreto de acetila (catalisador) sob agitação suave. Os tubos foram fechados em atmosfera de N₂, seguindo-se o aquecimento em banho maria com agitação a 100 °C por 1 hora; em seguida, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Adicionou-se lentamente 3,0 mL de KHCO₃ (10 % p/v) para paralisar a reação e neutralizar o catalisador, seguindo-se a agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 2.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, a fase superior (orgânica) foi então transferida cuidadosamente para frascos de armazenagem de 2,0 mL e as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás. As análises foram feitas em triplicata e o ensaio em branco foi realizado em paralelo com água deionizada (LEPAGE e ROY, 1986).

4.7.3.2 Análise da Composição dos Produtos de esterificação e transesterificação por Cromatografia Gasosa

Os ácidos graxos metilados, segundo metodologia descrita no item 4.7.3.1., foram analisados em cromatógrafo gasoso Shimadzu GCMS-QP2010 em uma coluna Omegawax 320 Supelco (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 e 280 °C, respectivamente. As condições utilizadas durante a cromatografia foram as seguintes: a

temperatura inicial da coluna foi de 150 °C, chegando a 210 °C no final da corrida. A temperatura do forno foi mantida a 150 °C por 5 min, seguida por um aumento até 210 °C, com uma rampa de 2 °C/min. A corrida foi mantida isotermicamente por 30 min. Foi aplicada a razão de split: 1:20, o volume de injeção foi de 1 µL, e o gás de arraste foi o hélio (1,1 ml / min).

A identificação dos ácidos graxos foi determinado pela comparação com a solução padrão comercial contendo 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco® 37 FAME Mix) e com a solução PUFA No.3 (*menhaden oil*), ambas adquiridas da Sigma-Aldrich. A quantidade de cada ácido graxo presente nas amostras foi expressa em mol%.

4.7.4 Análise da conversão do ácidos graxos em ésteres metílicos

A amostras contendo os produtos das reações de esterificação e transesterificação foram analisadas pelo laboratório de Combustíveis e Derivados de Petróleo da Escola de Química de acordo com a metodologia a seguir.

As análises por CLAE foram realizadas de acordo com o método desenvolvido por ANDRADE (2011). Utilizou-se uma coluna Thermo Scientific Acclaim™ de 250 mm de comprimento por 4,6 mm de diâmetro interno, com fase octadecilsilano (C-18) de 5 µm de tamanho de partícula com 120 Å de diâmetro de poro. A fase móvel foi composta por metanol (A) e uma mistura de 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v) (B). As fases foram sonicadas por 20 minutos antes do uso. As análises foram realizadas a 40 °C (temperatura do forno) com vazão de 1 mL/min e detecção UV a 205 nm. O equipamento empregado foi da Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA), modelo Ultimate 3000, composto por uma bomba quaternária modelo LPG-3400 SD, um detector por varredura de espectro ao ultravioleta modelo DAD-3000 e um injetor automático modelo WPS-3000 SL com alça de amostragem (ingl., "loop") de 250 µL. Um gradiente binário com duas rampas lineares foi empregado: 0 % a 50 % de B de 0 a 15 minutos, seguido de 50 % a 100 % de B até 25 minutos de corrida, e então por eluição isocrática com 100 % de B por mais 5 minutos. O tempo de corrida total foi de 40 minutos. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtro tipo membrana PTFE (Politetrafluoretileno) da Millipore (Bedford, EUA) com 0,45 µm de poro antes da injeção. O volume de injeção das amostras foi de 10 µL e foram aplicadas a 40 °C (temperatura do forno). As amostras (30 µL) foram dissolvidas em 970 µL de 2-propanol:*n*-hexano (5:4, v/v).

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito da fonte de carbono no crescimento celular

Neste presente trabalho *Y. lipolytica* foi cultivada em meios contendo como fonte de carbono óleo de fritura residual (OFR), óleo de oliva, ácido oleico e ácido esteárico preparados segundo a metodologia descrita em 4.4. Para cada fonte de carbono utilizada no cultivo de *Y. lipolytica* IMUFRJ 50682 foi determinado a curva de crescimento celular da mesma conforme mostra a figura 5.1.

No cultivo de óleo de fritura residual nota-se que o valor de concentração celular final (33,15 g/L) é maior do que nos demais (17,64 g/L, 10,72 g/L e 4,20 g/L para o cultivo com óleo de oliva, ácido oleico e ácido esteárico respectivamente). Esse resultado pode ser justificado pela diferença entre as composições das fontes no que se refere ao teor de ácidos graxos encontrado nas mesmas e da natureza química dos substratos utilizados.

A menor concentração celular encontrada no cultivo com ácido esteárico pode ser explicada por conter uma menor concentração do substrato segundo é relatado no item 4.4 deste trabalho.

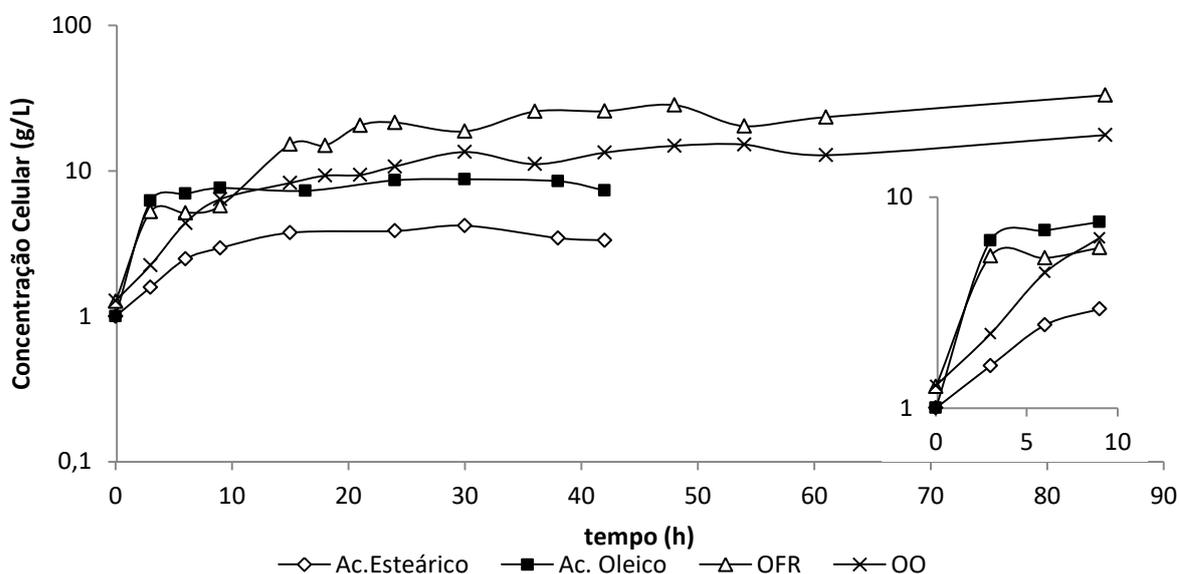


Figura 5.1 Cinética de crescimento celular de *Yarrowia lipolytica* a 250 rpm, 28 °C em meio de cultura (6,4 g/L ; extrato de levedo 10 g/L e antifoam 204 g/L acrescido de 1% óleo de fritura residual (OFR), óleo de oliva (OO), ácido oleico ou ácido esteárico*).

Yarrowia lipolytica é capaz de utilizar triglicerídeos como fonte de carbono e a primeira etapa deste metabolismo envolve a hidrólise deste substrato através de lipases, produzindo ácidos graxos e glicerol (FICKERS et al., 2005a).

Nunes (2015) cultivou *Y. lipolytica* em meio contendo óleo de oliva e óleo de fritura e observou um comportamento diáuxico para o meio contendo óleo de fritura residual e óleo de oliva. Similarmente, um comportamento diáuxico é notado neste mesmo trabalho para o OFR, ao notar um novo aumento da concentração celular a partir de 10 horas de cultivo, demonstrando um consumo de fonte de carbono de forma sequencial.

O cálculo das taxas específicas de crescimento no cultivo com óleo de oliva e ácido esteárico foram calculados e seus valores listados na tabela 5.2. Para os demais substratos o respectivo cálculo não foi possível devido a necessidade de mais pontos entre 0 h e 10 h de cultivo.

Tabela 5.1 Taxa específica de Crescimento e substrato utilizado para o cultivo de *Y. lipolytica*

| Substrato | Taxa Específica de Crescimento (h ⁻¹) |
|-----------------|---|
| Ácido Esteárico | 0,12 |
| Óleo de Oliva | 0,18 |

O óleo de fritura obtido neste trabalho, fornecido por uma rede de *fast food*, foi analisado por cromatografia gasosa, e sua composição em ácidos graxos pode ser observada na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Teor de ácidos graxos dos óleos de oliva , óleo de palma e óleo de soja (obtido na literatura) e concentração relativa (%) dos ácidos graxos do óleo de fritura residual analisado através de cromatografia gasosa, sendo o teor obtido da média de três análises.

| Ácido Graxo | Óleo de Oliva* | Óleo de Fritura Residual | Óleo de Palma* | Óleo de Soja* |
|-----------------|----------------|--------------------------|----------------|---------------|
| Palmítico 16:0 | 13,7 | 34,68 | 40,24 | 16,43 |
| Esteárico 18:0 | 2,7 | 4,18 | 4,98 | 4,14 |
| Oléico 18:1 | 74,0 | 39,5 | 42,31 | 18,37 |
| Linoleico 18:2 | 12,2 | 22,9 | 11,9 | 52,8 |
| Linolênico 18:3 | 0,3 | 0 | 0 | 4,33 |

*valores obtidos na literatura

Observa-se na Tabela 5.2 uma diferença muito grande entre a composição de ácidos graxos do OFR com o óleo de soja e com o óleo de oliva. O OFR apresenta um percentual de ácido palmítico, esteárico e linoleico superior ao do óleo de oliva, que apresenta um elevado percentual de ácido oleico.

Além disso, nota-se uma semelhança maior entre a composição do óleo de palma com o óleo de fritura residual, indicando sua provável origem.

5.2 Efeito da fonte de carbono sobre produção de lipases

Com o objetivo de estudar a produção das lipases de *Y. lipolytica* na presença de óleos ou ácidos graxos e verificar o potencial de indução dos mesmos, foram realizados experimentos em *shaker*, nos meios descritos no item 4.4. Os extratos enzimáticos foram obtidos por meio de ultrassom, em banho de gelo, potência de 150 W em sonicador 20 Hz, com máxima potência de 500 W, em 3 ciclos de extração e as atividades hidrolíticas foram quantificadas utilizando p-nitrofenil laurato como substrato (NUNES, 2015).

A figura 5.2 mostra o perfil de produção de lipases produzidas em ácido oleico (C18:1). É possível notar a máxima atividade da lipase associada à célula (LA) no tempo de 15 h (em torno de 650 U/g). A fração corresponde a lipase extracelular também atinge seu valor máximo de, aproximadamente, 13282 U/L nesse mesmo tempo de cultivo. Nota-se que o pico da lipase intracelular precede o pico de lipase extracelular. Esse perfil é condizente com o perfil descrito por Nunes (2015), que afirma que no início do cultivo, quando ácido oleico é abundante no meio, detecta-se maior atividade associada às células, pois em alta concentração, o ácido oleico se difunde facilmente para o interior da célula e é suficiente para suprir o crescimento celular. Desta forma, as lipases se acumulam na célula e são liberadas para o meio extracelular apenas quando a concentração de ácido oleico diminui.

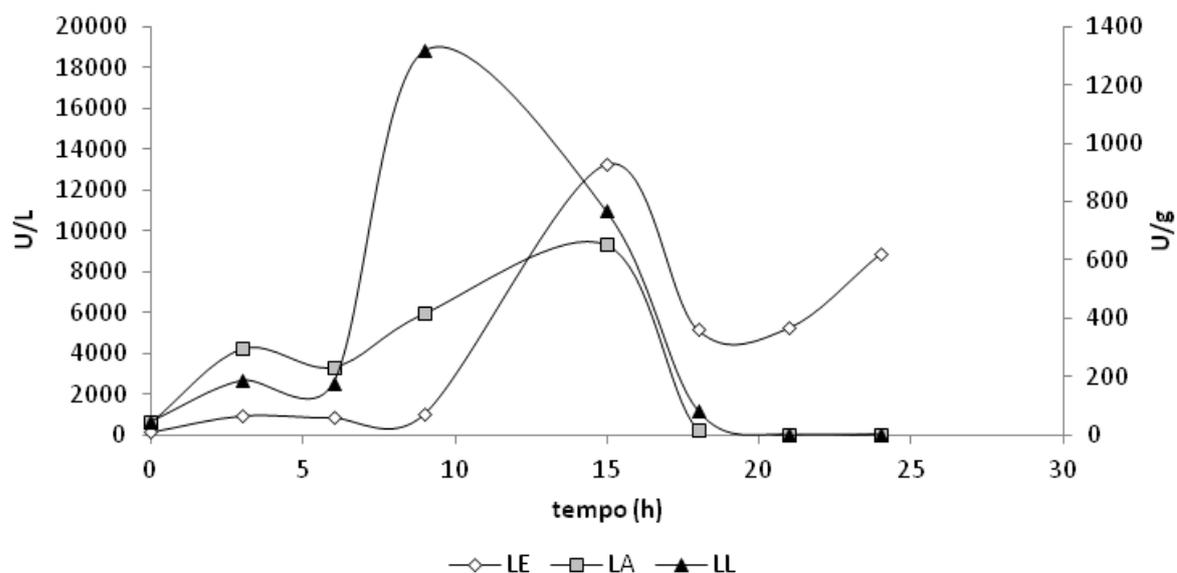


Figura 5.2 – Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* em meio com 1% com ácido oleico, cultivadas em Erlenmeyers, a 250rpm / 28 °C , por 42 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dados experimentais. LE – lipase extracelular; LL – lipase livre intracelular; LA – lipase associada à superfície celular.

A figura 5.3 mostra o perfil de produção de lipases produzidas em ácido esteárico (C18:0). É possível notar o máximo de atividade extracelular em um tempo menor de cultivo (antecipação do pico de atividade lipásica extracelular) quando comparado ao cultivo com ácido oleico. Isso se deve, provavelmente, a menor concentração inicial de ácido esteárico utilizada, o que induz a secreção da lipase para o meio exterior em um tempo menor, já que a fonte de carbono se esgota mais rapidamente. O valor máximo de lipase intracelular (LL) de 115,4 U/g, é observado no tempo de cultivo correspondente a 3 h juntamente com o valor máximo de lipase associada à célula (30,2 U/g). Além disso, ambas isoformas de lipases antecedem o pico de lipase extracelular. Esse resultado retifica as informações apresentadas por Pereira-Meirelles (1997), a qual afirma que a lipase extracelular é liberada quando o substrato encontra-se escasso enquanto as lipases intracelulares apresentam picos de atividade no início do cultivo.

Observa-se a maior produção de lipase extracelular no cultivo contendo como substrato o ácido esteárico. Os prováveis motivos para isso podem ser atribuídos a baixa concentração de ácido esteárico no meio e a maior afinidade da enzima pelo ácido oleico. A principal diferença entre o ácido esteárico e o ácido oleico é a presença de uma insaturação.

Akil *et al* (2016) avaliou a preferência de lipase de *Y.lipolytica* por ácidos graxos insaturados e concluiu que existe a preferência por ácidos graxos insaturados.

Pode-se inferir que a maior indução de lipase extracelular ocorreu em cultivo com ácido esteárico pois a falta de substrato de maior afinidade com o micro-organismo estimulou a produção de lipase extracelular na tentativa de buscar ácidos graxos que apresentem maior afinidade com o micro-organismo.

A concentração baixa do ácido graxo contribuiu para a alta indução de lipase extracelular pois a escassez de substrato estimula a produção dessas enzimas com o objetivo de aumentar a concentração de ácidos graxos no meio que podem ser provenientes da reação de hidrólise de possíveis TAG (triacilgliceróis) no meio de cultivo.

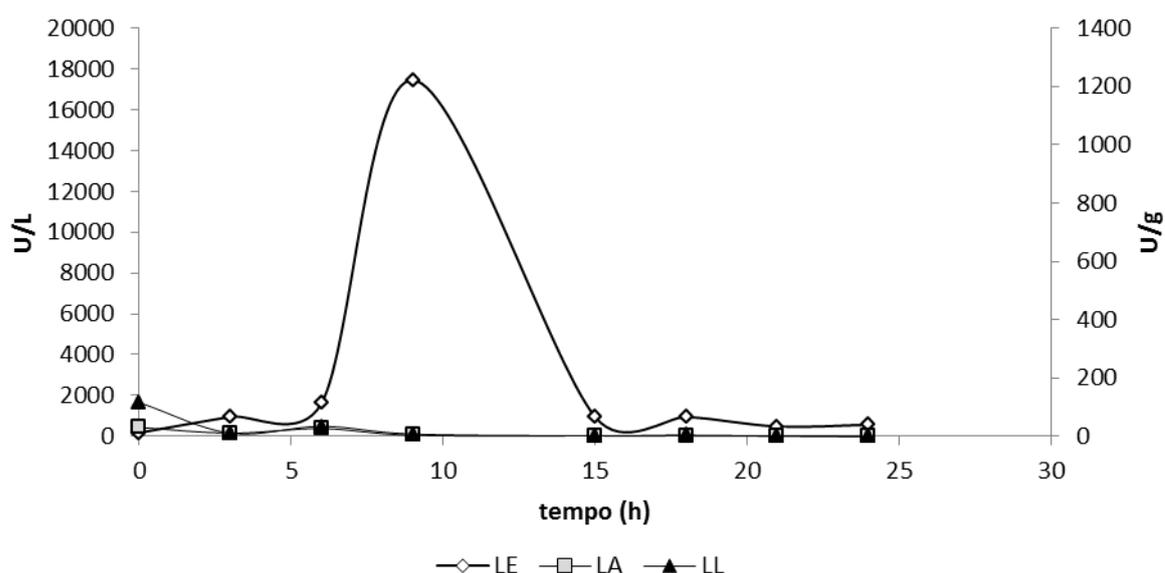


Figura 5.3- Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* em meio com 0,1% de ácido esteárico, cultivadas em Erlenmeyers, a 250rpm / 28 °C , por 42 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dados experimentais. LE – lipase extracelular; LL – lipase livre intracelular; LA – lipase associada à superfície celular.

A figura 5.4 exibe o perfil de produção de lipase na presença de óleo de oliva a 1%. Nota-se que no tempo de 42 h a lipase extracelular alcançou seu maior valor correspondente à 1720 U/L. Esse valor é inferior ao obtido no cultivo com ácido oleico e no cultivo com ácido esteárico.

Perreila-Meirelles (1997) avaliou a indução de lipase extracelular em cultivos de *Y.lipolytica* contendo ácido oleico e concluiu que o mesmo era melhor indutor de LE comparado ao óleo de oliva

.A lipase associada à superfície celular (LA) não apresentou valores expressivos comparados aos valores das demais isoformas de lipase, pois teve como valor máximo

73 U /g enquanto que para a lipase intracelular (LL) obteve-se atividade máxima de, aproximadamente, 466 U/g exibindo dois picos em seu perfil de atividade. Percebe-se que o óleo de oliva é melhor indutor de LL visto que o micro-organismo precisa hidrolisar a fonte de carbono presente no meio para utilizar como fonte de energia. Logo, manter a enzima protegida em seu interior foi evolutivamente mais vantajoso.

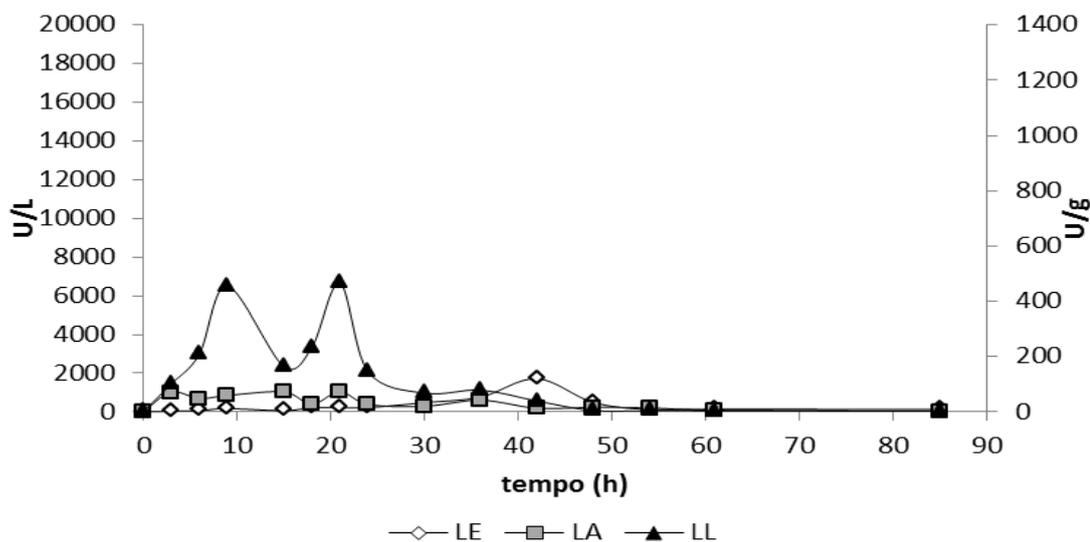


Figura 5.4-Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* em meio com 1% Óleo de Oliva, cultivadas em Erlenmeyers, a 250rpm / 28 °C, por 42 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dados experimentais. LE – lipase extracelular; LL – lipase livre intracelular; LA – lipase associada à superfície celular.

Nunes (2015) cultivou *Y. lipolytica* com óleo de oliva como indutor de lipase na concentração de 1% e não foi observado os dois picos para a lipase intracelular como é observado na figura 5.4. No entanto, o tempo de cultivo necessário para atingir o valor máximo da atividade da lipase extracelular foi o mesmo, assim como o tempo de cultivo para a máxima atividade da lipase aderida à superfície celular. Além disso, o valor das atividades das lipases foi maior neste presente trabalho para todas as isoforma de lipase.

A figura 5.5 apresenta o perfil de atividade das lipases para o cultivo de *Y. lipolytica* em óleo de fritura residual (OFR). Nota-se que o pico de atividade da lipase extracelular foi menor que o pico de atividade da lipase associada às células (LA), com valores de 279 U/L e 522 U/g respectivamente. Dentre as fontes de carbono analisadas, somente o óleo de fritura residual apresentou lipase associada à superfície celular com maior atividade que a lipase extracelular e foi a fonte que apresentou melhor produtividade de LA pois produziu mais em menor tempo. Pode-se inferir que a baixa

produção de LE no cultivo com OFR foi acarretada pela presença de substâncias inibidoras vindas da oxidação desse óleo.

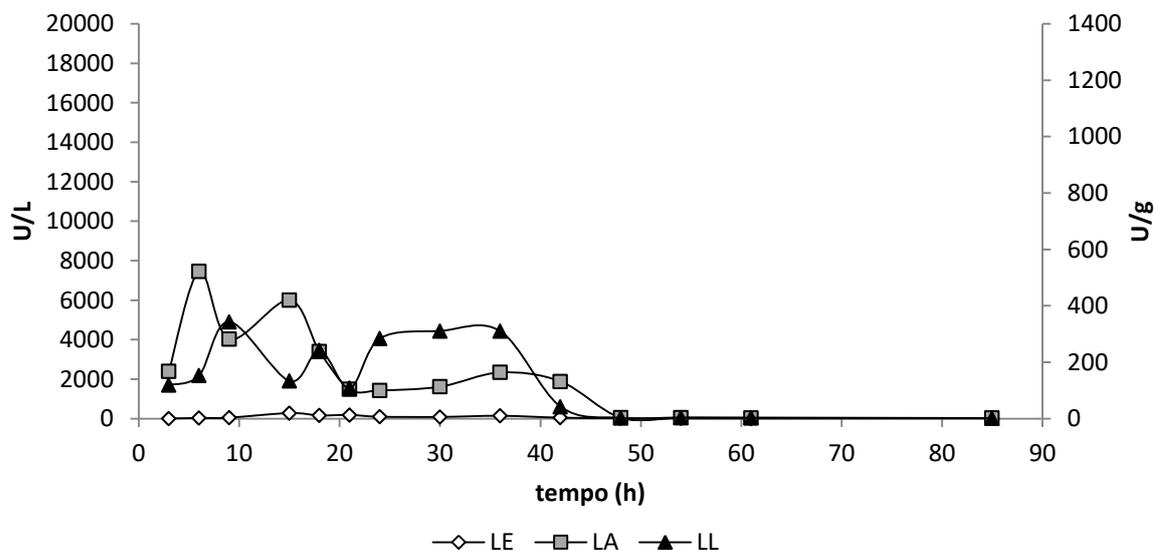


Figura 5.5-Atividade hidrolítica das lipases de *Y. lipolytica* em meio com 1% Óleo de Fritura Residual cultivadas em Elermeyers, a 250rpm / 28 °C , por 42 h. As linhas entre os pontos são somente para facilitar a visualização e não representam dados experimental. LE – lipase extracelular; LL – lipase livre intracelular; LA – lipase associada à superfície celular.

É possível notar diferenças nos perfis dos gráficos do óleo de oliva e do óleo de fritura residual. A maior indução de LA pelo óleo de fritura residual compõem essas diferenças. Ao relacionar o resultado do perfil de atividade em óleo de fritura residual com o resultado da análise do teor de ácidos graxos do mesmo por cromatografia gasosa, nota-se que o mesmo é composto majoritariamente por TAGs derivados do ácido palmítico e ácido oleico ou desses respectivos ácidos graxos. Pelos dados na literatura sabe-se que o óleo de oliva é composto majoritariamente por triacilgliceróis (TAG) derivados do ácido oleico. Esse resultado sugere a uma possível influência do ácido palmítico na indução de LA.

Tabela 5.3 Atividade máxima, obtida em cada fonte de carbono utilizada, de lipase associada à superfície celular e o respectivo tempo de cultivo.

| Substrato | Tempo (h) | Atividade Máxima (U/g) |
|-----------------|-----------|------------------------|
| OFR | 6 | 522 |
| Óleo de Oliva | 21 | 73 |
| Ácido Oleico | 24 | 653 |
| Ácido Esteárico | 9 | 26 |

A tabela 5.3 mostra a atividade máxima obtida nos diferentes substratos utilizados no presente trabalho. O OFR apresentou a maior atividade em menor tempo em relação aos demais substratos. Além disso, dentre todas as fontes de carbono utilizada, esta é a que apresenta menor custo e maior cunho sustentável pois trata-se de um rejeito industrial. Por isso, as LA obtidos no cultivo de OFR foram utilizadas para as reações de esterificação e transesterificação.

A razão pelo uso de lipases associadas à superfície é suportada pelo fato de ser uma enzima naturalmente imobilizada. Enzimas imobilizadas são de interesse industrial pois possibilitam o seu reuso no processo, o que contribui para a redução do custo final do processo. A reutilização de enzimas nos processos industriais é conveniente devido ao preço das mesmas.

5.3 Potencial de lipase associada nas reações de transesterificação e esterificação

Neste trabalho utilizou-se a lipase associada à superfície celular (LA) induzida pelo OFR no tempo de 6 h de cultivo nas reações de transesterificação e esterificação. O OFR foi o melhor indutor de produção de lipase associada à superfície celular. A maior atividade dessa lipase induzida por OFR ocorreu nas primeiras 6 h de cultivo. Portanto, a LA assim produzida foi testada nas reações de transesterificação e esterificação para avaliar seu potencial e considerar sua futura aplicação na produção de biodiesel por uma rota mais sustentável.

A escolha da lipase associada à superfície celular foi feita, pois trata-se de uma lipase imobilizada naturalmente, ou seja, não é necessário custos adicionais para fixá-las em algum suporte. O uso de enzimas imobilizadas implica no seu possível reuso. Para a produção de biodiesel por síntese enzimática tal fato é vantajoso pois pode ser um meio de contornar o alto custo das lipases.

Para avaliar as reações de transesterificação utilizou-se o método de CLAE desenvolvido por Andrade (2011). A figura 5.6 ilustra as faixas de cada componente em um cromatograma obtido por Andrade (2011) em uma análise do produto de transesterificação química utilizando óleo de canola. Pode-se perceber na figura que a faixa dos picos para ésteres metílicos de ácidos graxos (EsMAG) acontece no tempo de retenção de 5 a 10 minutos. Os monoglicerídeos (MAG) são eluídos no tempo de retenção de 0 a 5 minutos, os diglicerídeos (DAG) entre 10 a 15 minutos e os triglicerídeos (TAG) entre 15 a 25 minutos.

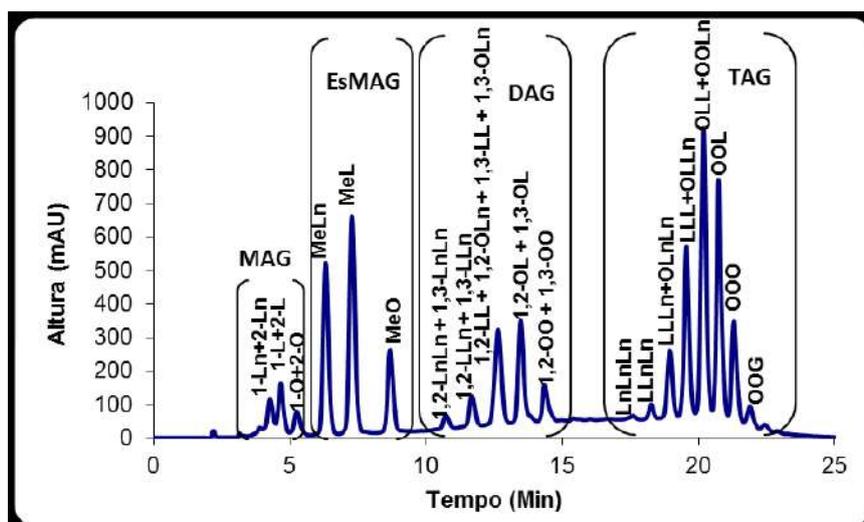


Figura 5.6 - Cromatograma do produto de transesterificação do óleo de canola com baixa conversão (CG=30%), em 5 min de reação e razão molar óleo vegetal:metanol de 1:3.(ANDRADE 2011).

5.3.1 Enzima e células liofilizadas

Como um primeiro teste, as reações de transesterificação foram realizadas com LA e as células íntegras (CI) produzidas nas mesmas condições (metodologia descrita no item 4.6.1) de forma a verificar se o tratamento de ultrassom seria realmente necessário para expor a enzima associada à célula. As mesmas foram liofilizadas para controlar o conteúdo de água na reação.

Foi realizada a análise da atividade destas enzimas (LA e CI) após o processo de liofilização. A LA exibiu uma queda considerável de atividade hidrolítica 29,4 U/g quando comparadas a sua atividade medida antes da liofilização (522 U/g). A célula íntegra também apresentou uma atividade de lipase baixa (24,0 U/g), mas similar a LA.

As figuras 5.7 e figura 5.8 mostram o resultado da análise por HPLC do produto de transesterificação utilizando LA e CI, respectivamente. O cromatograma mostra que não houve conversão pois há apenas picos na faixa do TAG.

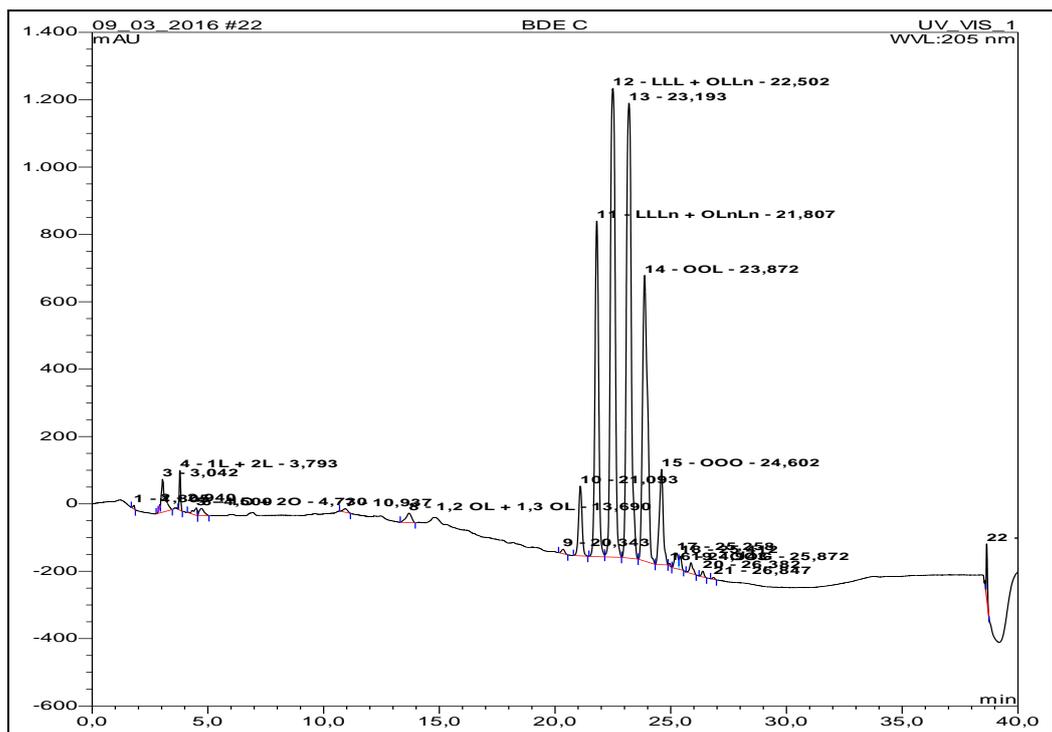


Figura 5.7- Cromatograma do produto de transesterificação catalisada pela célula íntegra liofilizada produzida após 6 h de cultivo de *Y. lipolytica* em OFR.

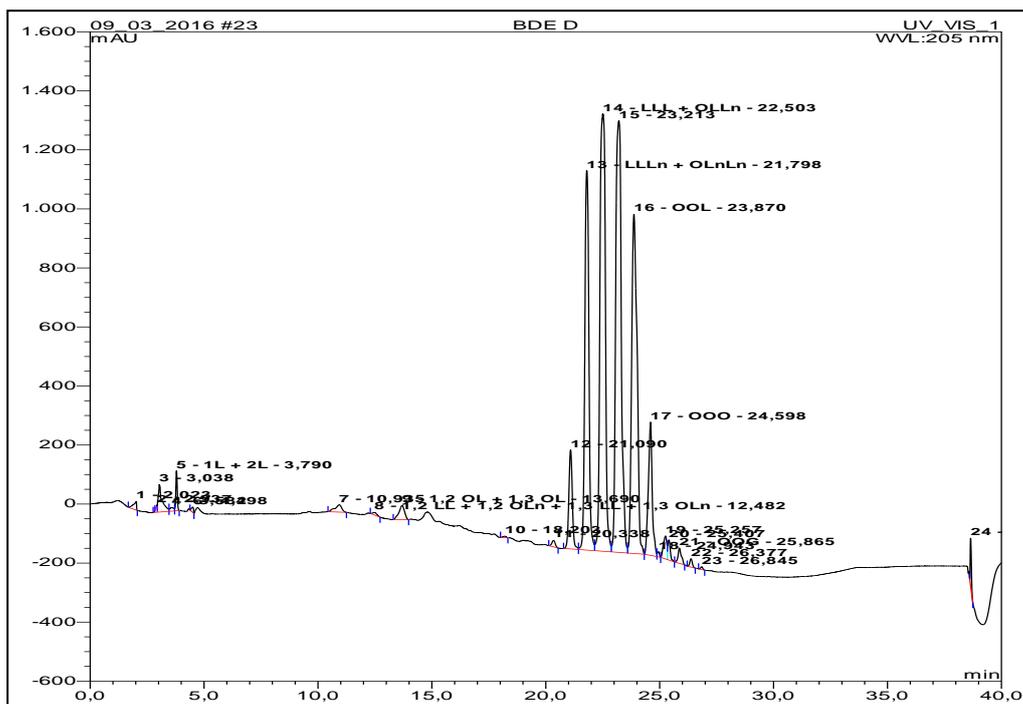


Figura 5.8- Cromatograma por HPLC do produto de transesterificação catalisada pela lipase associada superfície celular (LA) liofilizada produzida após 6 h de cultivo de *Y. lipolytica* em OFR.

A ausência de conversão pode ser justificada pela queda acentuada da atividade enzimática para as duas enzimas (LA e CI) após o processo de liofilização.

5.3.2 Lipase associada (LA) sem liofilização

5.3.2.1 Reação de transesterificação

A lipase associada (LA) foi obtida após tratamento das células do cultivo com *Y. lipolytica* em OFR no tempo de 6 h com ultrassom. Foi testado o potencial dessa enzima para a reação de transesterificação seguindo a metodologia descrita no item 4.6.1 b.

A figura 5.9 exibe o resultado do produto de transesterificação para a reação de 8,3 g de óleo e 3 g de etanol com 72 h de duração com uso de 15 mg de enzima ressuspendidas em 3 mL de água como catalisador. Nota-se que pelo cromatograma que não houve conversão, pois os picos observados correspondem apenas a região dos TAG, indicando que não houve conversão do óleo de soja em estéres metílicos.

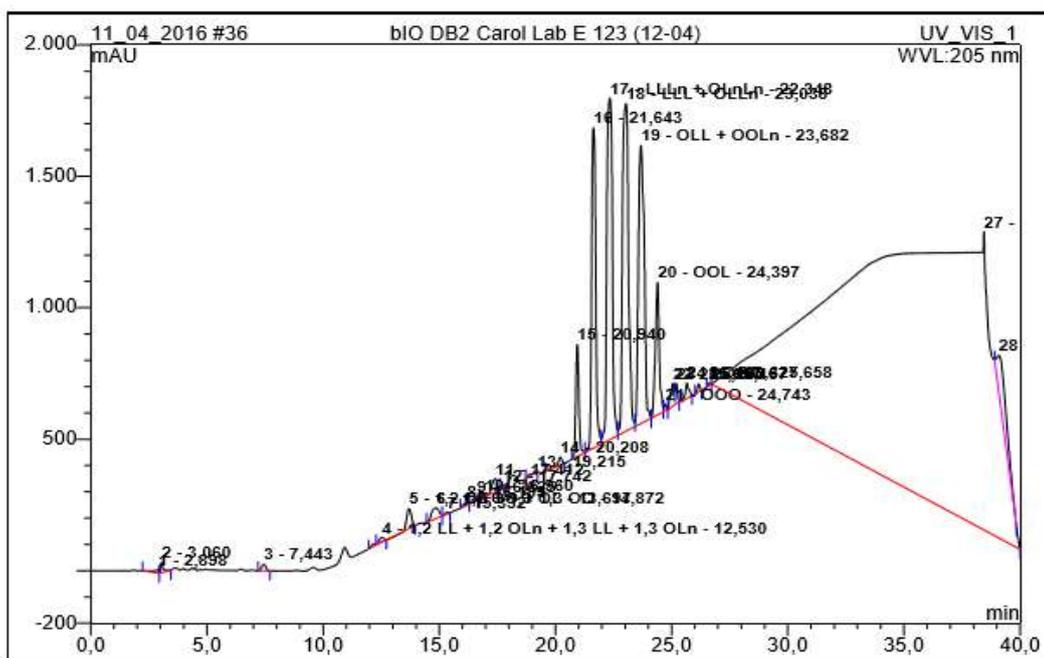


Figura 5.9- Cromatograma do produto de transesterificação da amostra contendo 8,3 g de óleo de soja e 3 g de etanol com 15 mg de enzima (Lipase associada à superfície celular produzida em OFR), ressuspensas em 3 mL de água.

A figura 5.10 exibe o mecanismo de reação da lipase. Nota-se o ataque do nitrogênio da molécula de histidina ao hidrogênio proveniente do segundo substrato. Esse substrato pode ser uma molécula de água, álcool ou éster dependendo da natureza química do radical R presente neste mesmo substrato. No entanto, a natureza química desse radical interfere na ionização desse hidrogênio, pois quanto maior a cadeia carbônica menor a acidez do hidrogênio devido ao efeito indutivo. Isso dificulta a retirada do hidrogênio pelo nitrogênio da molécula de histidina. Assim, pode-se entender a necessidade de maiores tempos para a reação de transesterificação com catálise enzimática.

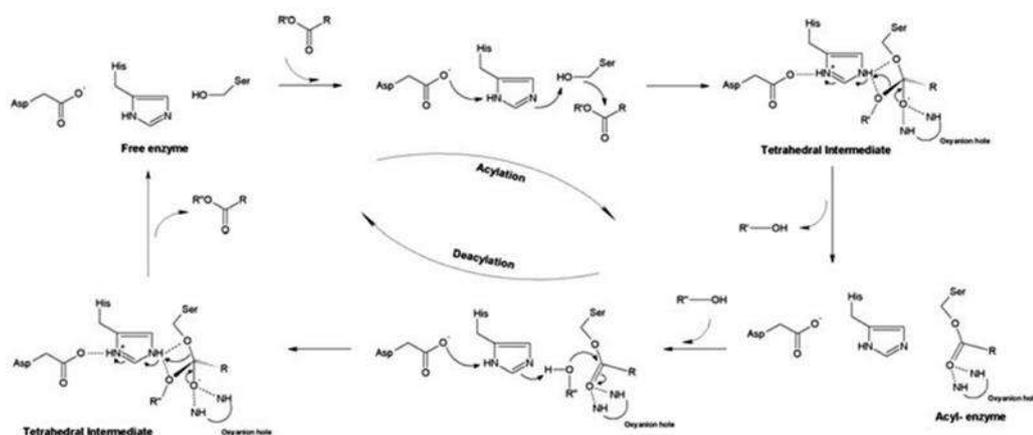


Figura 5.10 – Mecanismo de catálise de lipases (L. CASAS-GODOY et al 2012)

Tabela 5.4 Produção de biodiesel por catálise de lipases comerciais

| Fonte de Lipase | TAG | Condição | Conversão (%) |
|--------------------------------|--------------------------|--|---------------|
| <i>P.flurescens</i> | Óleo de Jatrofa | 40°C; 3:1 metanol:óleo; Hexano ; 48h | 72 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | Óleo de algodão residual | 37°C; 6:1 metanol:óleo; 48h | 70 |
| <i>A. niger</i> | Óleo de Palma | 25°C; 3:1 metanol:óleo; 72h | 87 |
| <i>Novozym[®] 435</i> | Óleo de Soja | 30°C; metanol; 3.5h | 97 |
| <i>Lipozyme TL IM</i> | Óleo de Soja | 40°C; metanol; 12h | 98 |

Os dados da tabela 5.4 ilustram as condições, fontes de lipase, reagentes e taxa de conversão das reações de síntese de ésteres metílicos por catálise enzimática obtidos na literatura (CANAKCI 2007; ALI *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2011.) . Observa-se que os tempos de reação se encontram entre 48h e 72h, para lipases não comerciais e entre 3.5h e 12h para lipases comerciais. O metanol é o álcool utilizado no processo referenciados na tabela.

O etanol foi escolhido para as reações de transesterificação e esterificação neste trabalho devido a característica sustentável do processo de obtenção do etanol e por ser menos nocivo que o metanol.

Além disso, nota-se na tabela o menores tempo de reação e maiores conversões, principalmente das lipases comerciais Novozym e Lipozyme, pois apresentam maior atividade enzimática que as enzimas utilizadas neste trabalho.

Portanto, foi realizado um novo teste, porém com maior tempo de reação

Para este novo teste, foram adicionadas 16 mg de enzima (LA) ressuspendidas em 3 mL de água com 10 mL de óleo de soja mais 6 mL de etanol. A mistura foi incubada por 2 semanas. O resultado é exposto na figura 5.11.

A figura 5.11 mostra que há picos na faixa dos ésteres etílicos o que evidencia a ocorrência de conversão do TAG em EsMAG. Observa-se também picos na região dos DAG e MAG que constituem produtos intermediário da reação de transesterificação. A ocorrência dessas espécies podem ser justificados pela reação incompleta de transesterificação ou da reação de hidrólise.

Há poucos dados na literatura sobre a síntese de biodiesel com lipase de *Y. lipolytica*. A maioria das sínteses enzimáticas de biodiesel é por lipases comerciais (TALUKER *et al.*, 2013, HERNÁNDEZ-MARTINS *et al.*, 2008), as quais apresentam atividade superior à atividade de lipase de *Y. lipolytica*. Além disso, a quantidade de água utilizada nas reações foi bastante elevado o que pode ter prejudicado as reações de esterificação e transesterificação.

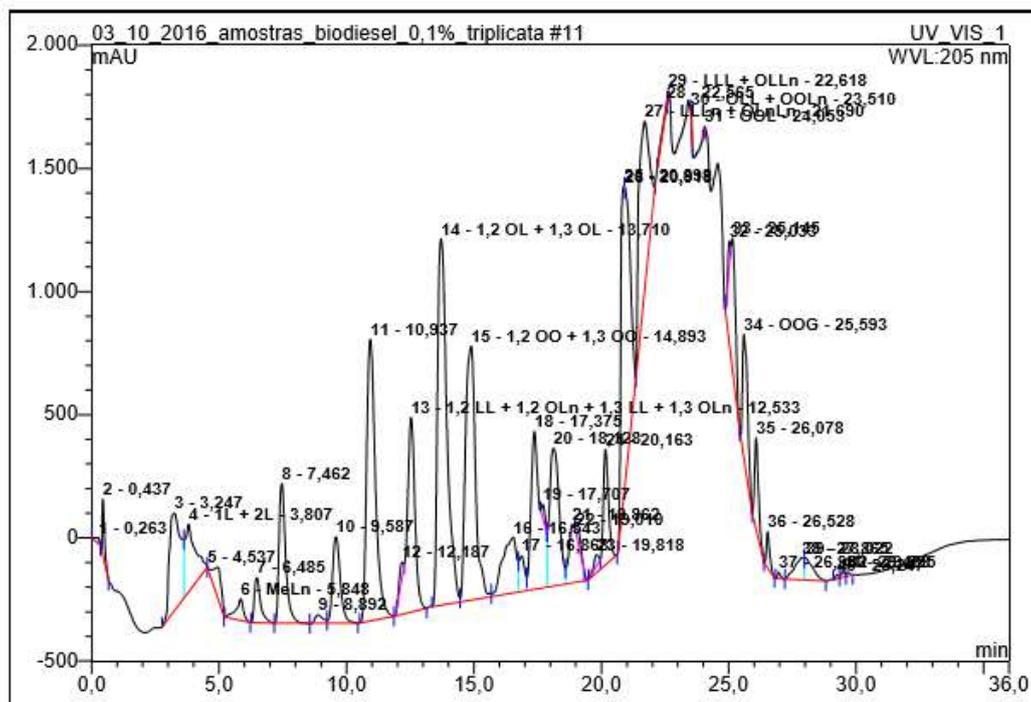


Figura 5.11 –Cromatograma do produto de transesterificação da amostra contendo inicialmente 10 mL de óleo de soja e 6 mL de etanol com 16 mg de enzima, ressuspendidas em 3 mL de água.

A escassez de água diminui a atividade da lipase quando compete com a construção da camada de hidratação no entorno da enzima, porém o excesso de água dificulta a reação de transesterificação pois a mesma passa a competir com reações de hidrólise e como mostra o mecanismo desta enzima, a reação de hidrólise é mais favorável que a reação de transesterificação ou esterificação. Portanto, o teor de água passar a ser um problema de otimização. O patamar ideal de água passa a ser específico para cada origem da enzima.

Além disso, a concentração de álcool é um problema de otimização. Como explicado anteriormente, o mecanismo da lipase mostra que reações de transesterificação e esterificação são menos favoráveis que as reações de hidrólise devido ao ataque do nitrogênio da molécula de histidina ao hidrogênio proveniente do segundo substrato. A medida que aumentamos a cadeia carbônica do segundo substrato diminuimos a acidez do hidrogênio e dificultamos a reação, porém quanto maior a cadeia carbônica menos tóxica o álcool é para enzima.

O excesso do álcool no meio reacional pode gerar um barreira hidrofílica em torno da estrutura enzimática, impedindo o acesso dos substratos hidrofóbicos ao sítio ativo. Há na literatura um consenso de que as lipases não são inativadas pelas moléculas de álcool em solução, mas pelo álcool insolúvel, presente na forma de gotas de óleo. Para evitar a inibição da enzima, a quantidade de álcool deve respeitar os limites de solubilidade no óleo. Segundo Iso *et al.* (2001), quando a vazão molar metanol:água for

As duas reações estudadas demonstraram precisar de um intervalo de tempo superior ao tempo demandado pela reação com catálise química. Neste presente, trabalho não foi utilizado um cossolvente porém há resultados na literatura sobre síntese enzimática de biodiesel com enzimas comerciais utilizando cossolventes.

Azócar *et al.* (2011) estudaram a produção de biodiesel a partir de óleo de fritura residual e metanol com a enzima Novozym 435 ®. Foi utilizada uma peneira molecular para extrair a água presente no óleo. O uso do meio anidro evitou que o produto final fosse consumido por hidrólise, reduzindo o conteúdo final de ácidos graxos e diglicerídeos e, conseqüentemente, aumentando o rendimento em metil-ésteres. Os autores mostraram as vantagens de se utilizar o terc-butanol como cossolvente da reação. Entre elas, pode-se destacar a redução da inibição enzimática causada pelo metanol ao longo da reação e a manutenção da atividade enzimática após vários ciclos de reutilização (até cerca de 17). O baixo ponto de ebulição do terc-butanol (82°C) favorece a sua escolha como cossolvente, devido à facilidade em se reutilizar a sua separação. A quantidade recomendada pelos autores foi de 0.75% em base volumétrica

Além disso, há informações na literatura sobre a influência do glicerol, subproduto da reação de transesterificação, nas enzimas. O glicerol tende a ser adsorvido pelos suportes hidrófilos das enzimas, diminuindo sua atividade catalítica. A inibição da Novozym 435 ® por glicerol foi estudada por WATANABE *et al* (2000) . Esses autores usaram 3 reatores de leito fixos contínuos em série, removendo o glicerol formado no primeiro reator por decantação e o refinado prosseguia para o segundo reator. Assim, os autores mostraram que a quantidade de metanol não reagido com a remoção intermediária do glicerol era menor.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o óleo de fritura residual, composto majoritariamente por triglicerídeos proveniente do ácido oleico e ácido palmítico, foi o melhor indutor de lipase associada à superfície celular dentre as fontes de carbonos utilizadas neste trabalho.

A melhor indução de lipase extracelular em cultivo com ácido esteárico indica que a melhor condição de produção de lipase extracelular ocorre quando há escassez de substratos de mais alta afinidade por *Y.lipolytica*.

Os resultados obtidos sobre o potencial desta lipase para as reações de esterificação e transesterificação sugerem direções para novos estudos. Neste trabalho, pode-se inferir a melhor obtenção de ésteres metílicos por meio de uma reação de esterificação que por meio de uma reação de transesterificação.

Portanto, a síntese de biodiesel enzimática continua sendo uma tecnologia promissora que precisa de maiores estudos para torna-la possível em escala industrial.

CAPÍTULO 7 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O potencial uso de lipases associadas à superfície celular mostrou uma potencial aplicação para obtenção de ésteres metílicos. Esse resultado é de interesse para a aplicação da mesma em processos de produção de biodiesel. Portanto, é necessário aumentar a conversão e diminuir o tempo reacional em reações de esterificação ou transesterificação catalisadas por esta enzima.

- Estudo da concentração ótima de água com o objetivo de favorecer a reação de transesterificação ou esterificação em detrimento da reação de hidrólise.
- Uso de um cossolvente pode auxiliar em conversões melhores e maiores taxas de reações e conseqüentemente menores tempos.
- Cultivo de *Y. lipolytica* em óleo de palma e ácido palmítico e verificar a atividade de todas as frações de lipases.

CAPÍTULO 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI A, KAUR M, MEHRA U. Use of immobilized *Pseudomonas* sp. as whole cell catalyst for the transesterification of used cotton seed oil. *J Oleo Sci* 2011;60:7-10.

AMARAL, P. F. F. *Produção de lipase de Yarrowia lipolytica em Biorreator Multifásico*. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ,– EQ, 220 p. 2007.

AMARAL, P.F.F.; LEHOCKY, M.; BARROS-TIMMONS, A.M.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; COELHO, M.A.Z.; COUTINHO, J.A.P. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast*, v. 23(12): 867-877, 2006.

AMARAL, P. F. F., DE ALMEIDA, A. P. R., PEIXOTO, T., ROCHA-LEAO, M. H. M., COUTINHO, J. A., & COELHO, M. A. Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 339-344, 2007.

AKIL, E.; CARVALHO, T.; BÁREA, B.; FINOTELLI, P.; LECOMTE, J; TORRES, A. G.; AMARAL, P.; VILLANEUVE, P.(2016). Accessing regio- and typo selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 109,101-111.

ANDUALEMA, B. e GESSESSE, A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications. *Review. Biotechnology*, v. 11: 100-118, 2012.

ANTCZAK,M.S.,KUBIAK,A.,ANTCZAK,T. e BIELECKI,S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy*, v. 34, p. 1185-1194, 2009.

BAN, K.; HAMA, S.; NISHIZUKA, K.; KAIEDAC, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; NODA, H.; FUKUDA, H. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 17: 157–165, 2002.

BARTERI, M., DIOCIAUTI, M., PALA, A., & ROTELLA, S.. Low frequency ultrasound induces aggregation of porcine fumarase by free radicals production. *Biophysical chemistry*, 111(1), 35-42, 2004.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 19: 219-237, 1997.

BIGEY, F.; TUERY, K.; BOUGARD, D.; NICAUD, J.-M.; MOULIN, G. Identification of a triacylglycerol lipase gene family in *Candida deformans*: molecular cloning and functional expression. *Yeast*, 20: 233–248, 2003.

BORDES, F.; BARBE, S.; ESCALIER, P.; MOUREY, L.; ANDRÉ, I.; MARTY, A.; TRANIER, S. Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical journal*, v. 99(7): 2225-2234, 2010.

BORDES, F.; BARBE, S.; ESCALIER, P.; MOUREY, L.; ANDRÉ, I.; MARTY, A.; TRANIER, S. Exploring the Conformational States and Rearrangements of *Yarrowia lipolytica* Lipase. *Biophysical journal*, v. 99(7): 2225-2234, 2010.

BORNSCHEUER, U. T.; ADMACZAK, M (2003) SOUMANOU, M; GUNSTONE, F (2002). *Lipids as Constituents of Functional Food*, Ed. P.J. Barnes & Associates, Bridgwater, p. 149-182.

BRIGIDA, A. I. S., AMARAL, P. F., GONÇALVES, L. R., & COELHO, M. A. Z. Characterization of an extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica*. In *Proceedings of the European Congress of Chemical Engineering 6, (ECCE'07) (Vol. 2)*, 2007.

BRIGIDA, A.I.S. *Imobilização de lípases utilizando fibra de casca de coco verde como suporte. para aplicações industriais*”. Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

CANAKCI M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. *Bioresour Technol* 2007;98:183-90.

CASAS-GODOY L., DUQUESNE S., BORDES F., SANDOVAL G., MARTY A. *Lipases & Phospholipases*. Humana Press 2012.

CIRIGLIANO, M.C. e CARMAN, G.M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(4):747-750, 1984.

COSTA, V. E. U., & AMORIM, H. D.. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. *Química Nova*, 22(6), 863-873, 1999.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. *Adv. Protein Chem.*, v. 45: 1-52, 1994.

FERRATO, F.; CARRIERI, F.; SARDA, L.; VERGER, R.; A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods in Enzimology*. v. 286: 327-347, 1997.

FICKERS, P.; NICAUD, J.M.; GAILLARDIN, C.; DESTAIN, J.; THONART, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96: 742-749, 2004.

FICKERS, P., FUDALEJ, F., LE DALL, M. T., CASAREGOLA, S., GAILLARDIN, C., THONART, P., & NICAUD, J. M.. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal genetics and biology*, 42(3), 264-274, 2005a.

FICKERS, P.; BENETTI, P.H.; WACHE, Y.; MARTY, A.; MAUERSBERGER, S.; SMIT, M.S.; NICAUD, J.M. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS yeast research*, v.5(6-7):527-543, 2005b.

FONTES, G. C., AMARAL, P. F. F., & COELHO, M. A. Z.. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*, 31(8), 2091-2099, 2008..

FICKERS, P.; MARTY, A.; NICAUD, J. The lipases from *Yarrowia lipolytica*: genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, v. 29: 632-644, 2011.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: Lipases. *African Journal of Biotechnology*, v. 9 (31): 4836-4844, 2010.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39 (2): 235-251, 2006

ISO, M.; CHEN, B.X.; EGUCHI, M., KUDO, T. e SHRESTHA, S. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. *Catal. B: Enzym. J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 16, n.1, p. 53-58, 2001.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology, *Tibtech innovation*, 16, 396-403.

LEE, C. C., LIÃO, H. F. E SHIELD, C. J. Optimization of lipase-Catalyzed Biodiesel by Response Surface Methodology. *Bioresource technology*, v, 88, p. 103-106, 2003.

MA, F.R. E HANNA, M. A. Biodiesel Production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, p.1-15, 1999.

MOFATAH, O.A.S.; GRBAVČIĆ, S.Ž.; MOFATAH, W.A.S.; LUKOVIĆ, N.D.; PRODANOVIĆ, O.L.; JAKOVETIĆ, S.M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.D. Lipase production by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. *J. Serb. Chem. Soc.* v. 77: 1–20, 2013.

MONTEIRO, C.B.; SCORALICK, R.R.; SIMÕES, D.C.; BRÍGIDA, A.I.S.; GONÇALVES, L.R.B.; COELHO, M.A.Z. Otimização da funcionalização de suportes lignocelulósicos com 3-glioxidopropil trimetóxi-silano. XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 2010.

NAKASHIMA, T.; KYOTANI, S.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Cell aggregation as a trigger for enhancement of intracellular lipase production by a *Rhizopus* species. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.70 (2): 85-89, 1999.

NICAUD, J-M.; FABRE, E.; GAILLARDIN, C. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, v.16: 253-260, 1989.

NICAUD, J-M.; MADZAK, C.; BROEK, P.V.D.; GYSLER, C.; DUBOC, P.; NIEDERBERGER, P.; GAILLARDIN, C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Research*, v. 2 (3): 371-379, 2002.

NUNES,P.M.B. Produção de lipase por óleo de fritura residual. Tese de Doutorado submetida ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2015

OTA, Y.; GOMI, K.; KATO, S.; SUGIURA, T.; MINODA, Y. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agr. Biol. Chem.*, v. 46, 1982.

OTA, Y.; NAKAMIYA, T.; YAMADA, K. Lipase from *Candida parapolitytica*. *Agr. Biol. Chem.*, v. 34: 1368-1374, 1970.

PAQUES, F.W. e MACEDO, G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. *Quimica Nova*, v. 29(1): 93-99, 2006.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V. Produção de lipases por *Yarrowia lipolytica*”, Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F. V., ROCHA-LEÃO, M. H. M., & SANT’ANNA JR, G. L. A stable lipase from *Candida lipolytica*. In *Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 73-85). Humana Press, 1997.

PEREIRA-MEIRELLES, F.V.; ROCHA-LEÃO, M.H.; SANT’ANNA, G.L. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Lett.*, v. 22 (1): 71-75, 2000.

SAMUKAWA T, KAIEDA M, MATSUMOTO T, BAN K, KONDO A, SHIMADA Y, *et al.* Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J Biosci Bioeng* 2000;90:180–3.

SHAMAR,R; CHRISTI, Y; BANERJEE, U.C (2001). Research review paper production purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*,19,627-662.

SHARMA, S., & KANWAR, S. S.. Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal*, 2014.

SZCZĘSNA-ANTCZAK, M.; ANTCZAK, T.; PIOTROWICZ-WASIAK, M.; RZYSKA, M.; BINKOWSKA, N.; BIELECKI, S. Relationships between lipases and lipids in mycelia of two *Mucor* strains. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39: 1214–1222, 2006.

THUREN, T. A model for the molecular mechanism of interfacial activation of phospholipase A2 supporting the substrate theory. *FEBS Lett.*, v. 229: 95–99, 1988.

TREICHEL, H., DE OLIVEIRA, D., MAZUTTI, M. A., DI LUCCIO, M., & OLIVEIRA, J. V.. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology*, 3(2), 182-196, 2010

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical molecular biological approaches. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 9, p. 113-148, 2000.

VOLPATO, Giandra. Produção, Purificação e Imobilização de Lipases de *Staphylococcus warneri* Ex17 Produzidas em Glicerol. 147 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

XIAO M, MATHEW S, OBBARD JP. A newly isolated fungal strain used as whole cell biocatalyst for biodiesel production from palm oil. *GCB Bioenergy* 2010;2:45-51.

XU WD, JING ZENG, DEHUA LIU Y. Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using lipozyme TL IM in a solvent-free medium. *Biocatal Biotransform* 2004;22:45-8.

WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms; cultural conditions and some properties of crude enzyme. *Agr. Biol. Chem.*, v. 41: 1353-1358, 1977.

ZAREVÚCKA, M. Olive Oil as Inductor of Microbial Lipase. *En: Olive Oil - Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*. Editor: Boskou, D. Shanghai, China. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/olive-oil-constituents-quality-health-properties-and-bioconversions/olive-oilas-inductor-of-microbial-lipase>. 2012

. ZHAO, H.; ZHENG, L.; WANG, X.; LIU, Y.; XU, L.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of new lipases from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.*, v. 33: 2445–2452, 2011

ZINJARDE, S.S. e PANT, A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, v. 42:6. 2002.

ZUCATTO, L. C., WELLE, I., & SILVA, T. N. D. Cadeia reversa do óleo de cozinha: coordenação, estrutura e aspectos relacionais. *RAE-Revista de Administração de Empresas*, 53(5), 442-453, 2013.

YOUNG, A., PESSOA, F., QUEIROZ, E. Tecnologias de produção de biodiesel. Produção em meio supercrítico e em meio enzimático. Ed Verlag 2015