

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
LIPASE DE *Geotrichum candidum* OBTIDA A PARTIR DE
MEIOS INDUSTRIAIS**

Rafael Resende Maldonado
Engenheiro de Alimentos , Unicamp

Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos

Campinas
2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M293p Maldonado, Rafael Resende
Produção, purificação e caracterização da lipase de
Geotrichum candidum obtida a partir de meios industriais /
Maria Isabel Rodrigues. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Maria Isabel Rodrigues
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Lipase. 2. Otimização. 3. Enzimas – Purificação.
4. Bioreator airlift. I. Rodrigues, Maria Isabel. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Rodrigues
(DEA/FEA/Unicamp)
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo
(DCA/FEA/Unicamp)
Membro titular

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Moraes
(DPB/ FEQ/Unicamp)
Membro titular

Prof^a. Dr^a. Eliana Setsuko Kamimura
(Departamento de Zootecnia/FZEA/ USP)
Membro titular

Dedico este trabalho a minha mãe, *Ercília*, a pessoa mais importante da minha vida e que sempre me ensinou a não desistir dos meus verdadeiros sonhos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aqui a todos aqueles que tanto contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

Agradecer a minha mãe, pelo seu amor, por sua dedicação, pelo apoio em todos os momentos. E por ser ela, a mãe e amiga tão maravilhosa que se revela a cada dia da minha vida.

Agradecer ao meu pai, pelas palavras de apoio quando resolvi vir pra Campinas, pelos momentos de carinho e por sempre me ensinar a sempre manter a serenidade diante dos problemas da vida.

À Bel, que durante os últimos sete anos conseguiu dar todo o sentido ao papel de orientadora. Não só nas orientações técnicas do laboratório, artigos, relatórios, mas também por seu exemplo de vida, seu carinho comigo e, por sempre acreditar no meu trabalho, seja nos momentos bons como nos momentos de dificuldades.

Ao Chico, pelo apoio, orientação, conselhos e a grande amizade durante todo este período.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB), que são tantos, que não daria pra citar todos aqui nestas poucas linhas. Cito aqui em nome de todos, a Fifa, pois ela é a figura que está ali junto conosco, todos os dias no laboratório, ajudando, orientando, cuidando para que tudo esteja da melhor forma possível para que todos possam realizar seus trabalhos.

À Susana e a Janaína, com quem trabalhei durante a graduação e com as quais tantas coisas aprendi. E ao Eduardo, excelente aluno e colega de trabalho, que muito contribuiu com a realização deste projeto.

À todos os meus amigos, que durante estes anos me ouviram falar tanto deste trabalho e, que agora, chega a sua fase de conclusão.

Agradecimentos a FEA e a Unicamp pela minha formação acadêmica de qualidade e à Fapesp e o CNPq pelo incentivo financeiro dado a este projeto.

Agradecer a Deus, por ter me dado a oportunidade de trilhar tão belo caminho, de conhecer pessoas tão maravilhosas e poder ter realizado um trabalho que tanto contribuiu para o meu crescimento, pessoal e profissional.

“Há algo mais belo que as mais belas descobertas, é o conhecimento da maneira pela qual são feitas”.

Leibniz

“Gostar é provavelmente a melhor maneira de ter, ter deve ser a pior maneira de gostar”.

José Saramago

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	3
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
Lipases – importância e aplicações	7
Produção da enzima	8
Obtenção do inóculo para produção de lipase por <i>Geotrichum candidum</i>	8
Composição de meios de fermentação para produção de lipase	10
Produção de enzimas em bioreatores	13
Etapa de <i>up stream</i> (clarificação prévia de substrato)	17
Purificação e caracterização de lipases	19
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS	24
Fluxograma das etapas do trabalho	24
Microrganismo	25
Obtenção do inóculo para produção de lipase por <i>Geotrichum candidum</i>	25
<i>Ensaios para determinação da quantidade de inóculo</i>	<i>25</i>
<i>Ensaios para determinação do tempo de incubação do inóculo.....</i>	<i>26</i>
<i>Análise do efeito da padronização do inóculo: incremento na atividade lipolítica e reprodutibilidade dos resultados</i>	<i>26</i>
Estudo da composição dos meios de fermentação	27
Produção da enzima em reator do tipo <i>airlift</i>	28
Produção da enzima em reator de mistura	28
Estudo da etapa de <i>up stream</i> (clarificação prévia do substrato)	28
Purificação da enzima	29
Caracterização enzimática	30
<i>Temperatura e pH ótimos</i>	<i>30</i>
<i>Estabilidade térmica</i>	<i>30</i>
<i>Energia de ativação (E_a) e energia de desativação (E_d)</i>	<i>31</i>
<i>Estabilidade em relação ao pH</i>	<i>32</i>

<i>Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}</i>	32
<i>Estabilidade ao congelamento</i>	33
Métodos analíticos	33
<i>Determinação da atividade lipolítica</i>	33
<i>Determinação do pH do meio de fermentação</i>	34
<i>Determinação do teor de proteína</i>	34
<i>Determinação de oxigênio dissolvido (OD)</i>	34
CAPÍTULO IV – ELUCIDATION OF THE EFFECTS OF INOCULUM SIZE AND AGE BY OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY <i>Geotrichum candidum</i>	35
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	36
MATERIAL AND METHODS	38
Effect of inoculum size	38
Effect of inoculum age	39
Lipase production	39
Lipase assay	40
RESULTS AND DISCUSSION	40
Determination of inoculum size	40
Inoculum age	43
Comparison of lipase production using different inoculum procedures	44
CONCLUSION	46
REFERENCES	46
CAPÍTULO V – OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY <i>Geotrichum candidum</i> USING ALTERNATIVE NITROGEN SOURCE	50
ABSTRACT	51
INTRODUCTION	51
MATERIAL AND METHODS	53
Inoculum	53
Optimized fermentation medium using yeast hydrolysate	53

Optimized fermentation medium using corn steep liquor	54
Analytical methods	54
RESULTS AND DISCUSSION	55
Optimized fermentation medium using yeast hydrolysate	55
Optimized fermentation medium using corn steep liquor	60
CONCLUSION	65
ACKNOWLEDGEMENTS.....	66
REFERENCES	66
CAPÍTULO VI – LIPASE PRODUCTION BY <i>Geotrichum candidum</i> IN AIRLIFT AND STIRRING FERMENTERS USING ALTERNATIVE NITROGEN SOURCES	
.....	69
ABSTRACT	70
INTRODUCTION	70
MATERIAL AND METHODS	72
Fermentation	72
Analytical methods	72
RESULTS AND DISCUSSION	73
Lipase production in airlift reactor	73
Lipase production in stirring reactor	78
Relationship between K_{La} and the lipase production and productivity	
.....	80
CONCLUSION	80
REFERENCES	81
CAPÍTULO VII – ESTUDO DA ETAPA DE UPSTREAM E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE <i>Geotrichum candidum</i> PRODUZIDA COM MEIOS INDUSTRIAIS	
.....	83
RESUMO	84
INTRODUÇÃO	84
MATERIAIS E MÉTODOS	85
RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO VIII – DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DAS LIPASES BRUTA E PURIFICADA DE <i>Geotrichum candidum</i> OBTIDAS COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	95
RESUMO	96
INTRODUÇÃO	96
MATERIAIS E MÉTODOS	97
Produção da enzima	97
Purificação da enzima	98
Determinação da temperatura e pH ótimos	98
RESULTADOS E DISCUSSÕES	98
Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases brutas	98
Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases purificadas	102
CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	105
CAPÍTULO IX – CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE <i>Geotrichum candidum</i> OBTIDA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	106
RESUMO	107
SUMMARY	107
INTRODUÇÃO	107
MATERIAIS E MÉTODOS	108
Obtenção das enzimas	109
Estabilidade térmica	109
Estabilidade em relação ao pH	109
Determinação da energia de ativação	110
Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}	110
RESULTADOS E DISCUSSÕES	110
Estabilidade térmica e estabilidade ao congelamento	110
Estabilidade em relação ao pH	112

Determinação da energia de ativação e desativação	113
Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}	114
CONCLUSÃO	115
REFERÊNCIAS	115
 CAPÍTULO X – CONCLUSÃO GERAL	 119

RESUMO

Lipases são enzimas amplamente presentes na natureza, podendo ser obtidas de fontes animais, vegetais ou de microrganismos. O interesse pela produção industrial de lipases aumentou muito nas últimas décadas, devido ao amplo potencial de aplicação destas. Estudos relativos a uma enzima abrangem diversos aspectos que determinam a viabilidade ou não da sua utilização. A tendência atual em bioprocessos é analisar de forma global a produção enzimática, analisando as etapas de pré-fermentação (*up stream*), obtenção da enzima, ampliação de escala (*scale up*), recuperação (*down stream*) e aplicação industrial.

Este trabalho analisou as etapas de pré-fermentação (clarificação dos meios de fermentação e padronização das condições de cultivo de inóculo), fermentação (seleção e otimização da composição dos meios de fermentação), ampliação de escala (estudo da produção da enzima em reator de mistura e em reator *airlift*), purificação da enzima (por cromatografia de interação hidrofóbica) e caracterização parcial das enzimas brutas e purificadas obtidas a partir de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552.

De um modo geral, o trabalho mostrou que é viável a produção de lipase a partir resíduos industriais em substituição a componentes convencionais de meio de cultura (como peptona e extrato de levedura). Três meios de fermentação foram otimizados para a produção da lipase quanto a sua composição (meio 1: 3,5% de hidrolisado de levedura e 0,7% de óleo de soja; meio 2: 8,0% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja e meio 3: 12,0% de água de maceração de milho clarificada e 0,6% de óleo de soja). Foram obtidas atividades enzimáticas máxima de 20,0 U/mL em frascos agitados e 24,0 U/ml em reator do tipo *airlift*, valores bem superiores aos citados na literatura. Por sua vez, o estudo conjunto da clarificação dos meios de fermentação e de purificação da enzima permitiu associar a viabilidade do processo de purificação com a redução de custos proporcionada pela utilização de resíduos industriais como fonte de nitrogênio. Por fim, a utilização de um reator não convencional (*airlift*) proporcionou a obtenção de níveis mais altos de atividade enzimática, uma vez que provoca menos danos ao desenvolvimento do micélio celular. Todos esses fatores associados indicam serem promissoras as possibilidades de utilização deste tipo de processo para fins industriais.

ABSTRACT

Lipases are most commonly found in nature, they can be obtained from animals, vegetables and microorganisms and it can be used on different industries. The industrial lipase production increased considerably in past few years, such as they have innumerable application on different industrial processing. Nowadays, lipases studies analyzed some steps of production as up stream and down stream steps, enzymatic production, scale up and industrial application. These factors together determine the viability of industrial process for enzymatic production.

This work analyzed the steps of up stream (previously clarification of fermentation medium and the optimization of inoculum conditions), fermentation (optimization of fermentation medium composite), scale up (enzyme production in stirred and airlift reactors), down stream (lipase purification for hydrophobic interaction chromatography) and partial characterization of lipases obtaining from *Geotrichum candidum* NRRL Y-552

This work showed that is viability to produce lipase changing conventional nutrients (as peptone and yeast extract) for industrial residues as nitrogen sources. Three fermentation media was optimized to lipase production (medium 1: 3.5% of yeast hydrolisate and 0.7% of soy oil; medium 2: 8.0% of corn steep liquor and 0.6% of soy oil and medium 3: 12.0% of clarification corn steep liquor and 0.6% of soy oil). The maximum lipase activities were of 20.0 U/mL in shake flasks and 24.0 U/mL in airlift reactor, values so high that those was reported in literature of the same microorganism. Then, the set of studied of previous clarification and enzymatic recovery allowed to associate the viable of purification process with cost reduction obtained using industrial residues as nitrogen source. In addition, highest level of lipase activity was possible using a no conventional reactor (airlift), due this reactor produced slowly damaged in cell mycelium. All these factors associated indicate that it is very promising the possibilities of utilization of this process on industry.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

Lipases compreendem um grupo de enzimas que ocorrem nos reinos animal e vegetal. A sua função biológica é catalisar a hidrólise de triglicerídeos para produzir ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essa reação é reversível e, portanto essas enzimas catalisam a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água (Hatzinikolaou et *al.*, 1996).

As lipase tem encontrando aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos (aditivos, modificadores de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergente (remoção de gorduras), tratamento de efluentes (remoção de produtos oleosos), farmacêutica (remédios, digestivos, enzimas pra diagnósticos, etc.. O potencial de uso industrial das lipases em detergentes, biotransformações e reações de interesterificação e transesterificação também têm despertado interesse por essas enzimas. Lipases com especificidade comprovada têm especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados podem ser mais facilmente obtidos por via enzimática do que em processos químicos convencionais.

Estima-se que atualmente cerca de 3% das enzimas utilizadas no mundo sejam lipases e o maior mercado produtor de enzimas é a Dinamarca, com cerca de 50% da produção mundial de enzimas comerciais.

Há um amplo campo de aplicações industriais para lipases, que vem se expandindo nas últimas décadas. Por outro lado, percebe-se uma tendência atual de estudar os processos biotecnológicos de uma forma mais ampla, tentando inter-relacionar estratégias e procedimentos adequados desde as etapas iniciais até aplicação final da enzima, com intuito de reduzir custos e melhorar a qualidade final do produto. Dentro desta perspectiva é que este trabalho foi realizado com o estudo das etapas de pré-fermentação (*up stream*), otimização dos meios de fermentação, ampliação de escala (*scale up*) para reatores de bancada, estudo da purificação e caracterização da lipase bruta e purificada de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552. Além de buscar uma inter-relação entre todas estas etapas, outros diferenciais deste trabalho foram: o estudo prévio das condições do inóculo, a utilização de

resíduos industriais como fonte de nitrogênio, a escolha do óleo de soja como indutor da produção e o uso de um reator não convencional na ampliação de escala.

O objetivo principal do trabalho foi obter uma lipase com potencial de aplicação, partindo de resíduos industriais como fontes nitrogênio para a produção. A escolha de um fungo como produtor da lipase ocorreu porque industrialmente este tipo microrganismo é mais interessante, pois produz lipases extracelulares, o que facilita a recuperação do bioproduto do meio fermentado.

Por sua vez, a escolha dos substratos (hidrolisado de levedura Prodex-lac[®] e água de maceração de milho) veio do baixo custo destes produtos e também da necessidade de promover um reaproveitamento destes materiais, que são fontes ricas em nitrogênio. O óleo de soja foi escolhido como indutor porque mostrou-se tão eficiente quanto o óleo de oliva (indutor comumente utilizado na produção de lipases) na obtenção da enzima como constatou anteriormente (Burkert, 2003). Além disso, o óleo de soja apresenta como diferencial um custo menor e uma maior oferta no mercado, especialmente no Brasil.

A utilização desses substratos mostrou-se uma boa alternativa para obtenção da lipase, com atividades enzimáticas em torno de 20,0 U/mL, superiores aos citados na literatura para o mesmo microrganismo e com redução de custos superior a 95% quando comparado com substratos convencionais (como peptona e extrato de levedura). Na fase de obtenção da enzima, um estudo prévio sobre as condições de inóculo foi realizado, utilizando meio sintético.

Como consequência do objetivo inicial, o desdobramento do trabalho focou na utilização do bioreator *airlift* para produção da enzima, justamente pela escolha de um fungo para o processo. Em trabalho anterior no LEB (Laboratório de Engenharia de Bioprocessos/FEA/Unicamp), Burkert et al. (2005) constataram que a ausência de agitação mecânica proporcionou valores de atividade lipolítica superiores aos obtidos em reator de mistura, utilizando o mesmo microrganismo deste trabalho. A ausência da agitação mecânica apresenta como vantagens a diminuição dos danos ao micélio celular, a redução dos custos com energia e a simplificação do design e operação do sistema.

Para efeito de comparação a enzima foi obtida também em um reator de mistura convencional. As condições otimizadas em ambos os fermentadores apresentaram

diferenças em relação à atividade enzimática máxima enzimática (24 U/mL no reator *airlift* e 17,0 U/mL no reator de mistura), mas foram muito similares em termos de produtividade, pois a máxima atividade enzimática foi obtida após 56 e 36 horas de fermentação, respectivamente

No entanto é importante ressaltar que, a otimização dos meios de fermentação e a utilização de um bioreator adequado ao tipo de microrganismo escolhido, não são aspectos suficientes para que o processo de obtenção da enzima, como um todo, seja viável. Neste caso, a utilização de resíduos industriais como substrato implica em um meio fermentado com uma grande quantidade de resíduos e impurezas, o que pode inviabilizar a etapa de purificação, fato este que já havia sido observado anteriormente por Treichel (2004) no processo de produção e purificação de inulinases.

Desta forma, o estudo da etapa de *up stream* foi realizado com o intuito de facilitar a posterior purificação da enzima (*down stream*). A água de maceração de milho utilizada foi previamente clarificada e a concentração ótima deste substrato clarificado no meio de fermentação foi alterada em relação ao valor previamente otimizado para o substrato não clarificado. Esta alteração proporcionou a manutenção de bons níveis de atividade lipolítica com o uso do substrato clarificado.

Tendo em vista também uma futura aplicação da enzima foi realizada a caracterização enzimática, com a determinação dos parâmetros tanto da enzima bruta como da enzima purificada. Nesta fase um estudo comparativo entre as quatro formas da enzima (enzima bruta e enzima purificada obtida com hidrolisado de levedura Prodex-lac[®] e enzima bruta e purificada obtida com água de maceração de milho clarificada) foi de grande importância para comparar modificações das características da enzima em função do substrato utilizado e dos processos de clarificação prévia e purificação da enzima (*up and down stream*).

Na etapa de recuperação (*down stream*), a purificação da enzima foi realizada utilização cromatografia de interação hidrofóbica, bastante eficiente para a purificação de lipases, conforme relatado anteriormente por Mendieta (1999). A melhor condição para purificação da enzima foi com a utilização de tampão fosfato 0,01 mol/L contendo 2,0

mol/L de NaCl na etapa de adsorção e com a utilização do mesmo tampão isento de NaCl para a etapa de dessorção.

Trata-se de um trabalho que se fundamentou na necessidade de uma avaliação ampla do processo de obtenção da enzima escolhida, fato cada vez mais necessário na área de processos biotecnológicos. A experiência acumulada pela equipe de trabalho do LEB (Laboratório de Engenharia de Bioprocessos/FEA/Unicamp) e a busca por integrar procedimento e resultados de trabalhos anteriores foram determinantes para o conjunto deste estudo e dos resultados por ele alcançados.

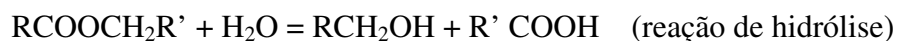
Visto a extensão do trabalho e a considerável quantidade de resultados obtidos optou-se pela apresentação da dissertação na forma de artigos. Os capítulos I, II e III apresentam a introdução geral do trabalho, a revisão bibliográfica e uma descrição geral das metodologias utilizadas e a seqüência de experimentos realizados. Os resultados e discussão são apresentados nos capítulos IV a IX no formato de artigos submetidos a revistas indexadas ou a congressos científicos. O capítulo X traz uma conclusão geral do trabalho.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lipases – importância e aplicações

Lipases são enzimas que atuam principalmente sobre óleos e gorduras através da clivagem de ligações ésteres glicerídeos, liberando ácidos graxos livres, monoglicerídeos ou diglicerídeos. Podem atuar também em processos de interesterificação ou transesterificação (Vulfson,1993).

Castro & Anderson (1995) descreveram as seguintes possibilidades de reações para as lipases:



Devido ao fato de poderem catalisar diversos tipos de processos diferentes, como descrito acima, as lipases representam cerca de 20% das enzimas utilizadas em biotransformações segundo Gittlesen *et al.* (1997) São diversos os campos de aplicação das lipases. A tabela 2.1 a seguir sintetiza as principais aplicações das lipases em diferentes tipos de indústrias de acordo com Castro & Anderson (1995).

Tabela 2.1 – Aplicações industriais de lipases

<i>Indústria</i>	<i>Aplicação</i>
Latícinos	Hidrólise de gordura do leite
Panificação	Aumento do aroma e da vida de prateleira
Cerverjaria	Aceleração da fermentação em função dos lipídios
Carne	Desenvolvimento do aroma e remoção do excesso de gordura
Farmacêutica	Digestão de óleos e gorduras em alimentos
Médica	Determinação de triglicerídeos no sangue
Papel	Tratamento de polpas de celulose
Tratamento de resíduos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas

Produção da enzima

Com o grande campo de aplicação das lipases, estudos para obtenção deste tipo de enzima são cada vez mais freqüentes e, muitos são os fatores que determinam a forma de obtenção e as características da enzima obtida. Dentre estes fatores é relevante citar que a produção da enzima depende do microrganismo utilizado, condições de inóculo, composição do meio de fermentação, aeração, agitação, pH do meio de fermentação, temperatura, etc.

A otimização das condições de produção da enzima deve ser realizada a fim de obter o máximo da produção enzimática, considerando também as questões de custo de obtenção, viabilidade técnica de produção e recuperação da enzima a partir do meio fermentado, seleção de substratos adequados, etc. A seguir há um breve relato de trabalhos encontrados na literatura que procuram situar a importância de cada uma destas questões, as diferentes possibilidades de compatibilizar todos estes aspectos e os resultados que vêm sendo obtidos nos últimos anos.

Obtenção do inóculo para produção de lipase

A obtenção do inóculo é uma etapa de fundamental importância para se atingir bons níveis de atividade enzimática na fermentação e, também, para garantir a reprodutibilidade dos resultados. A utilização de fungos em fermentações torna a tarefa de reproduzir os resultados mais difícil, pois o fato de serem organismos pluricelulares faz com que padronização do inóculo seja mais complexa. É comum nestes casos a utilização da contagem de esporos em câmara de Newbauer para preparação do inóculo, no entanto, tal procedimento não garante necessariamente bons níveis de atividade enzimática na fermentação e nem uma boa reprodutibilidade dos resultados.

De acordo com a equipe do Laboratório de Sistemática Microbiana (DCA/FEA/Unicamp) uma boa opção à contagem de esporos é realizar o cultivo do microrganismo em placa de Petri utilizando meio sólido e, após a incubação, retirar uma área circular do meio sólido contendo o microrganismo e transferir assepticamente para o meio de fermentação. Tal procedimento reduz a variabilidade do processo e melhora a padronização. Além da quantidade de esporos utilizados e a quantidade de inóculo, a composição do meio de cultivo, pH e tempo de incubação são outros fatores muito

relevantes na obtenção de um inóculo capaz de levar a resultados satisfatórios e reprodutíveis no processo fermentativo.

No caso de fungos em que ocorre a formação de *pellets*, (como o *Geotrichum candidum* utilizado neste estudo), os fatores linhagem do fungo, tamanho ou quantidade do inóculo, do tipo de meio de crescimento e as condições físicas utilizadas são determinantes na formação dos *pellets* e na obtenção de bons resultados na fermentação, conforme observado por Whitaker & Long (1973).

Outros autores também relatam a necessidade de se avaliar as condições do inóculo. Vannot *et al.* (2001), estudaram a produção de lipase por *Penicillium cyclopium* em estado estacionário, sendo uma das variáveis analisadas a quantidade de inóculo, além da concentração do substrato e o pH. A melhor condição de produção da enzima ocorreu com a utilização de 1,0% de água de maceração de milho, pH de 5,5 e com inóculo de 10^4 esporos/mL. Em continuidade ao trabalho anterior, Vannot *et al.* (2002) estudaram o efeito da quantidade de inóculo e da concentração de substrato (água de maceração de milho) para produção de lipase de *Penicillium cyclopium*. A melhor condição para obtenção do inóculo, que proporcionou uma alta produção de lipase, foi com a utilização de 1,0% de água de maceração de milho e 3.200 esporos/mL. A fermentação foi realizada com pH inicial de 5,0, temperatura de 25°C e 120 rpm de agitação. Observa-se na comparação dos dois trabalhos sequenciais apresentados que a redução na quantidade de inóculo proporcionou um maior nível de atividade lipolítica na fermentação.

Outro fator que contribui para a qualidade final do inóculo é a composição do meio de cultivo. Burkholder & Sinnott (1945) observaram que *Penicillium notatum* formou *pellets* lisos em meio sintético enquanto o mesmo microrganismo apresentou *pellets* rugosos em meio complexo contendo água de maceração de milho. A diferença morfológica dos *pellets* formado pode influenciar nos resultados obtidos durante a fermentação.

Além dos fatores citados acima, o tempo de incubação do inóculo é também preponderante para o processo, seja pela influência no tempo total do processo quanto na viabilidade das células e/ou esporos obtidos. O efeito da quantidade e da idade de inóculo foi avaliado por Sen & Swaminathan (2004) na produção de surfactantes, que geralmente é feita em dois estágios. No referido trabalho, os autores analisaram os efeitos individuais e cumulativos da utilização de dois estágios de inóculo na produção de surfactantes a partir

de *Bacillus subtilis* DSM 3256, em relação às variáveis quantidade e idade de inóculo. A condição ótima foi obtida com 56 horas de incubação e 5,5% (v/v) de inóculo e 4,5 horas e 9,5% (v/v) de inóculo, para o primeiro e segundo estágios, respectivamente.

As dificuldades iniciais de padronização do inóculo e a pequena produção da enzima na fermentação levaram a necessidade de se avaliar as condições do inóculo para produção da lipase. As variáveis analisadas foram a quantidade e ao tempo de incubação do inóculo, que segundo relatos da literatura, são as mais importantes quando se trata de obter um inóculo com condições satisfatórias ao processo fermentativo.

Composição de meios de fermentação para produção de lipase

O estudo de meios industriais de fermentação para obtenção de produtos biotecnológicos tem sido de grande importância nos últimos anos. A busca por composições que levem a uma maior produção enzimática é um dos principais objetivos dos estudos realizados. No entanto, outros fatores ganharam importância significativa mais recentemente, como a necessidade da obtenção de composições com menor número de componentes, obtenção de atividades enzimáticas máximas em determinada condição, reaproveitamento de resíduos e outros biomateriais e principalmente, redução dos custos de produção.

Vários trabalhos encontrados na literatura relatam as diferentes aplicações de lipases microbianas, bem como a utilização de meios industriais para produção desta e de outras enzimas.

A produção de lipase extra e intracelular de *Geotrichum candidum* foi estudada por Jacobsen et al. (1989 a). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo contendo peptona e a adição de óleo de oliva ou tween 80 ao meio aumentou significativamente a produção. A produção de lipase intracelular no meio contendo óleo de oliva foi superior a de lipase extracelular, na fase inicial de crescimento celular. No entanto a produção total de lipase extracelular foi maior do que a de lipase intracelular, com ambos os indutores da produção.

Em continuação do trabalho anterior, Jacobsen et al. (1989 b) realizaram a produção e caracterização de múltiplas formas de lipases de *Geotrichum candidum*. O meio de cultura continha a seguinte composição, por litro de água destilada: uréia, 3g; MgSO₄.7H₂O, 2g; K₂HPO₄.3H₂O, 2g; ácido cítrico.1H₂O, 1g; óleo de oliva, 10g; goma

arábica, 1g. A produção máxima de lipase extracelular de cerca de 60U/mL foi encontrada com 27 horas de fermentação.

Outras fontes de nitrogênio também foram exploradas na produção de lipases. O uso de fontes não convencionais de carbono e nitrogênio vem crescendo nos últimos anos, como mostram os trabalhos a seguir. Água de maceração de milho, hidrolisados protéicos, resíduos ricos em açúcares, proteínas ou material oleoso estão entre os que mais freqüentemente são utilizados na produção de lipases.

A indução de triglicerídeos e ácidos graxos na produção da lipase por *Geotrichum candidum* ATCC34614 foi estudada por Shimada et al. (1992). Neste caso, o microrganismo foi cultivado a 27 °C em meio com 5% de água de maceração de milho e 0,5% de NH₄NO₃ como fontes de nitrogênio obtendo cerca de 80 U/mL de atividade enzimática de lipase.

Cordova et al. (1998) investigaram a produção de lipase por *Rhizomucor pusillus* e *Rhizopus rhizopodiformis* por fermentação semi-sólida utilizando uma mistura de bagaço de cana e pasta de óleo de oliva. A produção da enzima apenas com o bagaço de cana foi de 4,99 e 1,73 U/g, respectivamente, enquanto que com a mistura de bagaço de cana e pasta de óleo de oliva na proporção de 50% de cada componente, obteve-se 20,24 e 79,60 U/g, respectivamente.

Medeiros, 1999 estudou os efeitos das fontes de carbono (óleo de soja, óleo de oliva e glicose) e fonte de nitrogênio (água de maceração de milho e nitrato de amônio) para a produção de lipase por *Geotrichum* sp à 30°C e 120 rpm em frascos agitados. A técnica de planejamento experimental e análise da superfície de resposta foram utilizadas para otimização da produção de lipase. Os resultados obtidos com as condições otimizadas foram atividade enzimática de 18 U/mL utilizando 2,1-2,5% de nitrato de amônio, 13-15% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja.

Miranda et al. (1999) estudaram a produção de lipase por *Penicillium citrinum* utilizando um resíduo do refinamento de óleo vegetal como indutor na produção. Foram utilizados meio de cultura com 1,0% de óleo de oliva e 0,75% de (NH₄)₂SO₄ e outro com 1,6% do resíduo industrial e 0,75% de (NH₄)₂SO₄. Os resultados obtidos foram comparados, sendo a atividade máxima obtida com a utilização do óleo de oliva de 2,63 U/mL e com o resíduo industrial, de 5,79 U/mL. Foi avaliada ainda a influência da fonte de

nitrogênio e do pH inicial no meio utilizando o resíduo industrial. O sulfato de amônio na concentração de 0,75% mostrou-se como a melhor fonte de nitrogênio obtendo-se uma atividade enzimática de 6,74 U/mL, com 1,6% de resíduo industrial no meio. O pH inicial do meio de 5,5 propiciou uma maior atividade enzimática de 5,26 U/mL, utilizando meio de cultura com 1,6% de resíduo industrial e 0,75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Maldonado *et al.* (2001) investigaram a produção de lipase por *Penicillium restrictum* utilizando diferentes indutores para produção de lipase (óleo de oliva, de soja e de milho). Foi obtido a máxima atividade lipolítica de 23,0 U/mL, utilizando-se meio contendo 3,0% de peptona e 1,5% de óleo de milho, após 96 horas de fermentação. A fermentação foi realizada a 30° C, 160 rpm e pH inicial do meio de 5,5.

Burkert *et al.* (2002) e Maldonado *et al.* (2002) investigaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio de cultivo contendo peptona como fonte de nitrogênio e óleo de soja como indutor da produção e também as condições de pH inicial do meio de fermentação e a temperatura de produção da enzima. As condições otimizadas de produção da enzima foram 3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja, pH inicial do meio de fermentação igual a 7,0, temperatura de produção de 30°C, agitação de 250 rpm.

Tan *et al.* (2004) estudaram a produção de lipase por *Penicillium cammembertii* Thomm PG-3. O meio otimizado para produção da enzima é composto por: 4% de pasta de soja (isenta de gordura), 0,5% de óleo de jojoba, 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e Tween 60. A fermentação foi realizada a 28°C por 96 horas com pH inicial de 6,4. A máxima atividade enzimática obtida foi de 500 U/mL.

Dos trabalhos citados na literatura é possível verificar que há um grande número de estudos de produção de lipase utilizando fungos. Este fato, já citado anteriormente, pode ser atribuído ao fato dos fungos produzirem enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação da enzima do meio fermentado, tornando este tipo de microrganismo mais interessante do ponto de vista de processo.

Diferentes substratos são citados na literatura para produção de lipase. Em relação à fonte de carbono, em geral, utiliza-se sempre algum tipo de óleo vegetal ou resíduo do processo de refino destes óleos. Este trabalho escolheu o óleo de soja como fonte de carbono e indutor na produção de lipase devido aos resultados citados na literatura serem

similares aos obtidos com outros óleos e ao fato do óleo de soja apresentar um baixo custo e ter uma ampla produção no cenário mundial e também no Brasil. As fontes de nitrogênio relatadas são muito diversas, sendo tanto de origem orgânica quanto inorgânica. Um dos problemas da escolha da fonte de nitrogênio consiste no binômio produção *versus* custos. Peptona e extrato de levedura são fontes comumente utilizadas, mas apresentam custos elevados. Por este motivo, vários estudos buscam outras fontes de nitrogênio para obtenção de lipases. Nos trabalhos citados anteriormente verifica-se a utilização de peptona, uréia, água de maceração de milho, nitrato e sulfato de amônio, etc, como fontes de nitrogênio. Neste trabalho, a opção foi por avaliar fontes alternativas de nitrogênio (Prodex-lac[®] e água de maceração de milho) que apresentam baixo custo e grande quantidade de nitrogênio total em sua composição, o que as torna potencialmente interessante como fontes de nitrogênio para processos biotecnológicos.

Produção de enzimas em bioreatores

Reatores de mistura são muito empregados nos mais diversos tipos de processos biotecnológicos. Vários trabalhos na literatura procuram determinar as melhores condições de agitação e aeração para operação destes reatores, bem como influência de diferentes tipos de impulsores.

Jacobsen et al. (1989 b) obtiveram lipase de *Geotrichum candidum* em reator de mistura utilizando temperatura de 30°C, agitação de 750 rpm e aeração de 1600mL ar.min⁻¹. O máximo de concentração de massa celular, de 5,9 g.L⁻¹ foi obtido após 22 horas de crescimento e o máximo de atividade lipolítica foi obtido após 27 hora de processo.

A produção de lipase de *Penicillium simplicissimum* foi estudada por Sztajer et al. (1992) que obtiveram 6,9 U/mL de atividade lipolítica em reator de mistura com temperatura de 30°C, 100 rpm de agitação e 120L/h de aeração, após 48 horas de fermentação.

Freire et al. (1997 a) utilizando *Penicillium restrictum* obteve 13 U/mL de atividade lipolítica com 200 rpm e 0,5 vvm de aeração e agitação, respectivamente.

Os reatores *airlift* são caracterizados por uma circulação de fluido num modelo cíclico definido, através de canais construídos com este propósito. A diferença entre o

líquido contendo bolhas de ar na seção de fluxo ascendente (*riser*) e do líquido na seção de fluxo descendente (*downcomer*) promove a circulação do fluido no reator.

Diferentes variações de reatores *airlift* têm sido desenvolvidas, com diferenças na geometria do reator, contando com reatores cilíndricos e retangulares, com reciclo externo e tubos concêntricos, tipos de separadores gás-líquido com a finalidade de melhorar a transferência de oxigênio dissolvido em diferentes regiões no interior do reator.

As vantagens do reator *airlift* quando comparado a reatores convencionais vão desde os custos de implantação até a operação. O reator *airlift* destaca-se por necessitar de uma menor demanda de energia, uma vez que não requer agitação mecânica, é de simples construção em escala industrial, principalmente pela ausência de partes móveis e geometria simples, além de ter grande relação altura x diâmetro, razão pela qual pode ser construído em áreas com restrição de espaço. Entretanto, as maiores vantagens do reator *airlift* em relação aos reatores convencionais são a maior transferência de oxigênio, com menor custo e menor área ocupada.

Através da investigação na produção de β -D-glucosidase (E.C.3.2.1.21), endo-1,4- β -D-glucanase (E.C.3.2.1.4) e D-xilanase (E.C.3.2.1.8) por *Aspergillus fumigatus* IMI 255091 em fermentador com agitação convencional e fermentador *airlift* foi possível observar que, no fermentador *airlift*, as atividades enzimáticas alcançadas foram cerca de 20% maior que no fermentador com agitação mecânica. Este fato pode ser causado pela ação cisalhante do agitador que, embora não afete a enzima já produzida, provavelmente danifique o micélio do fungo, inibindo a subsequente produção da enzima (Wase et al., 1985).

Chevalier & Noue (1987) investigaram a produção de α -amilase com células livres e imobilizadas de *Bacillus subtilis* em fermentadores de bancada e em fermentador *airlift* utilizando as mesmas condições de aeração a 1/3 vvm e temperatura de 30°C. No fermentador convencional o crescimento foi mais lento que no *airlift*, atingindo a concentração máxima de biomassa após 24 h. A taxa máxima de crescimento para o *airlift* foi de 0,55 h⁻¹ e 0,37 h⁻¹ para o fermentador convencional. Porém, a diferença mais significativa foi na produção da enzima. Após 12h de fermentação no *airlift* foram observados 18 U/mL de atividade enzimática enquanto no fermentador convencional, 15,7

U/mL após 24 h. Verificou-se ainda que 7,09 mg/L (99,4% de saturação) e 5,20 mg/L (71% de saturação) foram as medidas de oxigênio dissolvido no *airlift* e no fermentador convencional, respectivamente.

Schmidhalter & Canevascini (1992) estudaram a produção de um sistema de enzimas celulolíticas de *Coniophora puteana* em fermentadores *airlift* devido a este fungo ser muito sensível à agitação mecânica convencional. Foram testadas diferentes fontes de carbono como a glicose, celobiose e celulose amorfa que influenciaram na taxa de crescimento específico variando em 0,082, 0,068 e 0,062 h⁻¹ e o rendimento 0,45, 0,39 e 0,34 g/g, respectivamente.

A produção de fosfolipase D (PLD) em processo contínuo no *airlift* e processo em batelada e batelada alimentada em fermentador com agitação mecânica convencional foi pesquisada usando células de *Streptomyces lydicus* livres e imobilizadas em quitosana. Na cultura contínua com células imobilizadas foi observada uma alta atividade e produtividade numa taxa de diluição de 0,33 h⁻¹. A atividade foi de aproximadamente 12,7 U/mL na cultura contínua com células imobilizadas, enquanto a produtividade foi de 4,19x10³ U/L.h, cerca de 3 vezes maior que a cultura em batelada (1,16x10³ U/L.h), 3,6 vezes a cultura em batelada alimentada (1,27x10³ U/L.h) e 3 vezes maior que a cultura contínua com células livres (1,36x10³ U/L.h) (Shinonaga *et al.*, 1996).

Kim *et al.* (1997) verificaram a produção de celulase, xilanase e β-glucosidase de *Aspergillus niger* KKS em diferentes biorreatores. Foram utilizados os fermentadores tipo frascos agitados, agitação mecânica convencional, borbulhamento em coluna e *airlift*, os três últimos foram testados em processo batelada e batelada alimentada. Em geral melhores rendimentos e produtividade das enzimas foram encontrados nos reatores com borbulhamento em coluna e *airlift*. Os melhores resultados para a celulase foram um rendimento de 84 FPA IU/g, em reator com borbulhamento em coluna, e produtividade de 9,7 FPA IU/L.h, com agitação convencional, alcançados no modo de operação em batelada alimentada. A xilanase obteve um rendimento máximo de 9100 U/g em reator com borbulhamento em coluna operando em batelada, e produtividade de 823 U/L.h no *airlift* em batelada alimentada. No caso da β-glucosidase o melhor desempenho foi conseguido

com o fermentador *airlift* em batelada, alcançando um rendimento de 370 U/g e 26 U/L.h de produtividade.

Siedenberg *et al.* (1997) estudaram a produção de xilanase por *Aspergillus awamori* em tanque agitado e aerado e em reator *airlift*. Entre outros fatores verificaram que a produção da enzima foi influenciada pelo tamanho do *pellet* formado e pela concentração de esporos adicionados ao meio de cultivo. No tanque agitado, maiores produtividades no processo de produção de xilanase foram obtidas com pequenos *pellets*, em contraste com os resultados encontrados no *airlift*. A produção no tanque agitado foi cerca de 8 vezes maior que no reator *airlift*.

A produção de L(+) ácido láctico foi estudada por Yin *et al.* (1997), verificando-se que após 4 dias de cultura a concentração de L(+) ácido láctico foi de 82 g/L em um fermentador de bancada enquanto que no fermentador *airlift* a produção de 92 g/L foi alcançada em 3 dias, sendo as taxas de produção de 0,85 g/L.h e 1,27 g/L.h e o rendimento de 68% e 78%, respectivamente. O menor rendimento obtido no fermentador com agitação pode ser devido a aderência do micélio no vidro, o que resultaria numa diminuição na transferência de oxigênio e substrato, fato este não observado no fermentador *airlift*.

Jin *et al.* (1998), fazendo parte de um programa de tratamento de efluentes estudaram a produção de proteína de biomassa microbiana e α -amilase fúngica produzida por *Aspergillus oryzae* com o efluente líquido do processamento do amido em um reator *airlift* e condições ótimas de crescimento a pH 5,0 e 35°C conseguiram obter 6 g/L de proteína de biomassa microbiana contendo 38% de proteína e 55 EU/mL de α -amilase em 12 horas de cultivo em batelada com um reator com 3,5 litros.

Um bioreator do tipo *airlift* foi utilizado para produção de proteína fúngica e glucoamilase de *Rhizopus oligosporus* DAR 2710 a partir do de um efluente contendo resíduo do processamento de amido (SPW). O processo foi realizado por 14 h a 35°C e pH inicial igual a 4,0. A biomassa fúngica apresentou 46% em massa de proteína fúngica, que é segura tanto pra consumo humano quanto animal. O processo foi realizado sem esterilização inicial e sem hidrólise prévia do efluente. (Jin *et al.*, 1999)

Kamimura *et al.* (1999) estudaram a produção de lipase por *Geotrichum* sp. em reator de bancada utilizando meio complexo (com água de maceração de milho). Uma

máxima atividade lipolítica de 28 U/mL foi obtida após 10 horas de fermentação, sob agitação de 1,0 vvm, agitação de 400 rpm e temperatura de 30°C.

Oda et al. (2005) utilizaram um reator do tipo *airlift* com volume de 20,0L para produção de lipase de *Rhizopus oryzae* que posteriormente foi imobilizada e utilizada na obtenção de biodiesel a partir de óleos vegetais.

Burkert et al. (2005) estudaram a produção de lipase em reator de mistura e em reator do tipo *airlift* utilizando *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 e meio sintético. Os resultados obtidos demonstraram uma melhor performance da produção no reator *airlift*, no qual a produtividade foi cerca de 40% maior do que no reator de mistura, comparando-se as condições ótimas de operação: 1,0 vvm para reator *airlift* e 1,0 vvm e 300 rpm para reator de mistura.

O estudo de lipases em bioreatores é bastante relatado na literatura, mas poucos são os trabalhos que utilizaram reator do tipo *airlift* para obtenção de lipases. No entanto, a aplicação de reatores do tipo *airlift* é muito relatada para sistemas que utilizam fungos como parte biológica do sistema. A ausência da agitação mecânica danifica menos os micélios celulares, proporcionando melhores resultados na fermentação.

A escolha deste trabalho foi por utilizar a faixa de valores de aeração estudados anteriormente por Burkert et al. (2005) de 1,0 a 2,5 vvm para estudo no *airlift* e a condição otimizada do reator de mistura (1,0 vvm e 300 rpm) para comparação da performance dos dois sistemas.

Etapas de *up stream* (clarificação prévia de substrato)

De acordo com relatos da literatura, a utilização de fontes não convencionas de carbono e nitrogênio vem sendo amplamente estudada para produção de enzimas. Tais fontes apresentam como atrativos percentuais relativamente elevados de carbono, nitrogênio e/ou outros nutrientes, abundância de oferta e custos reduzidos, pois em geral são materiais com pouca ou nenhuma destinação industrial. No entanto, se por um lado a utilização destas fontes não convencionais traz benefícios, por outro lado etapas subseqüentes do processo podem se tornar pouco viáveis, como a recuperação e purificação

da enzima do meio fermentado. Isso se deve ao fato de que, de modo geral, estas matérias-primas contêm muitas impurezas e material particulado, o que torna difícil a operação de sistemas de purificação. Uma alternativa para evitar tal problema é realizar um tratamento prévio de clarificação e remoção de material particulado destas matérias-primas antes da fermentação. Alguns trabalhos recentes relatam esta necessidade que vem surgindo na área de bioprocessos nos últimos anos.

Por exemplo, Treichel (2004) obteve bons resultados no processo de purificação de inulinase obtida a partir de meios complexos ao realizar uma prévia clarificação dos substratos utilizados na etapa de produção (água de maceração de milho e melaço). A clarificação prévia destes substratos remove uma série de impurezas do meio, especialmente materiais particulados, que tornariam bem mais difícil a tarefa de recuperação da enzima do meio fermentado.

Alguns relatos na literatura dão conta de processos de pré-tratamento para melaço, resíduo industrial rico em açúcares, muito utilizado em processos biológicos. Kaseno & Kokugan (1997) utilizaram microfiltração com membrana de cerâmica para o pré-tratamento de melaço na produção de etanol. Eles observaram que cerca de 99,5% de glicose e 90,2% dos açúcares totais foram metabolizados pelos microrganismos no melaço tratado contra 83,1% de açúcares totais metabolizados quando se utilizou melaço não tratado.

Kim & Shoda (1999) estudaram a clarificação de melaço através de um processo semicontínuo de produção de peroxidase de *Geotrichum candidum*. A peroxidase agiu na clarificação de melaço por quatro semanas com 80% de melaço clarificado. Em um segundo teste, o microrganismo foi imobilizado em uma espuma de polietileno e o tempo de ação da peroxidase aumentou para mais de oito semanas.

Mendes (2006) realizou um estudo de pré-tratamento de melaço e água de maceração de milho para produção de inulinase. A melhor condição de processo foi obtida quando os dois substratos foram tratados separadamente, o que evitou a floculação dos componentes do meio de fermentação. Através do estudo com planejamento fatorial, as melhores condições do pré-tratamento foram estabelecidas com utilização de 4% (p/p) de carvão ativo tipo ANFC, sob agitação de 150 rpm, 60°C e 10 minutos.

Conforme citado nos trabalhos acima, a utilização de pré-tratamentos de meios complexos é uma área que vem despertando interesse dos pesquisadores, especialmente com a tendência atual de analisar os processos biotecnológicos de um ponto de vista mais global, pensando como uma etapa influencia as etapas subsequentes. A remoção de resíduos na fase anterior a fermentação pode contribuir para melhorar as condições de obtenção do bioproduto (removendo substâncias inibidoras) e facilitar o processo de recuperação do bioproduto a partir do caldo fermentado (etapa de *down stream*).

Purificação e caracterização de lipases

O estudo da purificação de enzimas é importante para obtenção de enzimas com alto grau de pureza e com bons níveis de atividade enzimática. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática permite a utilização de pequenas quantidades da enzima, o que é vantajoso tanto em termos de processo como de estocagem da enzima.

O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. Após a fermentação, a enzima encontra-se no meio contendo uma série de outros compostos que não são de interesse. A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de purificação. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima.

A cromatografia de interação hidrofóbica é um método bastante citado na literatura para a purificação de lipases. A enzima é adicionada a coluna cromatográfica em um solução tampão de alta força iônica. Como as lipases, em geral, apresentam um caráter mais apolar, estas ficam adsorvidas a matriz utilizada na coluna. Posteriormente, com a redução da força iônica da solução tampão, a enzima então sofre dessorção, sendo recuperada com menor grau de impurezas. A escolha deste método para a purificação da enzima neste trabalho deve-se também ao fato dele já ter sido aplicado com sucesso para a purificação de lipase de *Geotrichum sp.*, realizada por Mendieta (1999) e por Kamimura *et al* (2001).

Outros autores relatam estudos relativos à purificação enzimática. Kordel & Schimd (1990) adaptaram um processo de purificação enzimática à característica hidrofóbica da lipase *Pseudomonas sp.* ATCC 21808. A lipase bruta foi concentrada por ultrafiltração e submetida a cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose, seguida de uma cromatografia de interação hidrofóbica em Octyl Sepharose. A eluição da enzima na coluna de O-Sepharose foi feita com 2-propanol. O processo obteve uma recuperação de 56% e fator de purificação de 159 vezes.

De acordo com Baillargeon (1990) no estudo da purificação e especificidade de lipases de *Geotrichum candidum* a partir de um preparo bruto comercial da enzima, foram isoladas duas enzimas denominadas lipase A e B. A lipase A continha 11,4% de carboidratos e mostrou ser estável com 99% de atividade residual após incubação a 30°C por 24 horas. As lipases A e B apresentaram composição de aminoácidos similares

Apesar da importância do estudo da purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo escolhido, este sempre vai causar alterações na enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação.

Dessa forma, a caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque, pois estas podem ser afetadas tanto pelo processo de purificação como por outros fatores (como tempo e forma de estocagem, alterações no meio de fermentação e nas demais condições de obtenção, etc.). Além de fornecer dados para compreender a atuação e as alterações sofridas pela enzima, a caracterização enzimática também fornece dados que devem ser considerados no momento da aplicação desta enzima para um processo. Temperatura e pH ótimos, estabilidade térmica e com pH, meia-vida e outros parâmetros são decisivos na hora do dimensionamento de um processo enzimático.

Existe uma diversidade muito grande de lipases que podem ser obtidas a partir de microrganismos e estas podem apresentar características muito distintas entre si. Há lipases que tem sua ótima em pH ácido, outras atuam próximas a neutralidade e, ainda aquelas ditas alcalinas. Em relação à temperatura ótima também há um amplo espectro de lipases atuando em várias faixas de temperatura. Estas são apenas duas características que

influenciam no tipo de aplicação que pode ser dado a uma enzima. Essas e outras características enzimáticas podem ser afetadas por uma série de fatores, como forma de obtenção da enzima, tipo de reação em que a enzima é aplicada, tempo, temperatura e pH de estocagem, processos de purificação, etc. Sendo assim, o estudo da caracterização enzimática é alvo de muitos estudos relatados na literatura e ele foi incluído neste trabalho para analisar os efeitos da utilização de diferentes fontes de nitrogênio na obtenção da enzima, da aplicação de processo de clarificação da fonte de nitrogênio e do processo de purificação.

Na literatura é comum encontrarmos relatos de estudos de purificação feitos conjuntamente com a caracterização enzimática, assuntos amplamente estudados na área de Bioquímica e também de Bioprocessos.

A caracterização e a purificação de lipases de *Geotrichum candidum* foram estudadas por Veeraragaven et al. (1990). As lipases I e II foram purificadas 35 vezes com 62% de recuperação em atividade e 94 vezes com 18% de recuperação, respectivamente. As lipases I e II têm valores de pH ótimo de 6 e 6,8 e pontos isoelétricos de 4,56 e 4,46, respectivamente. As enzimas são estáveis na faixa de pH 6 a 8.

Philips & Pretorius (1991) purificaram e caracterizaram a lipase extracelular de *Galactomyces geotrichum*, um fungo teleomorfo do *Geotrichum candidum* e compararam as características das duas enzimas. A quantidade máxima de lipase produzida pelo *Galactomyces geotrichum* foi observada após 24-36 horas de incubação, e meio preparado com óleo de oliva. A lipase modificada mostrou ter diferente composição de aminoácidos em relação a lipase de *G. candidum*. A atividade máxima da enzima de *G. geotrichum* obtida neste trabalho foi a pH 7,75 e 30°C e a mesma perdeu toda atividade quando submetida a tratamento à 56°C por 35 minutos. A especificidade das lipases por ácidos graxos insaturados foi semelhante na comparação das duas enzimas.

Uma preparação bruta de lipase de *Ustilago maydis* ATCC 14826 foi injetada em coluna de troca iônica S-Sepharose, obtendo-se duas frações (I e II) com atividade lipolítica. A lipase I foi aplicada em coluna de butyl Sepharose, com recuperação global de 12%. A lipase II foi purificada com recuperação de 13,5%, em coluna de DEAE-Sepharose e butyl Sepharose (Lang et al., 1991).

Rua & Balesteros (1994) relatam a purificação de lipases de *Candida rugosa* em coluna hidrofóbica de Phenil Sepharose e colunas de Sephadex G-25 e Sephacryl HR-100. A recuperação global foi de 50% e o fator de purificação de 9,6 vezes.

Com uma coluna hidrofóbica de butyl-Sepharose equilibrada com tampão tris 50 mmol/L (pH 8,0) contendo 0,1 mol/L NaCl, Rua *et al.* (1997) purificaram lipase de *Bacillus therothamulatus*. A eluição foi feita com ácido clórico 1%, no mesmo tampão. O fator de purificação obtido foi de 28 vezes e a recuperação de 51%.

A purificação da lipase produzida por *Alcaligenes sp.* foi estudada por Sousa (1996) através de fracionamento com sulfato de amônia e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50, obtendo-se 2 frações com atividade de lipase, denominadas frações I e II,

Macêdo (1997 a) estudou a produção de lipase por *Geotrichum sp.*, em frascos agitados, nas condições operacionais de 30 °C por 48 horas de incubação com 100 rpm de agitação. A lipase de *Geotrichum sp.* apresentou atividade máxima de 6 U/mL na faixa de pH 5 a 8 a 45 °C. A atividade enzimática foi acrescida em 45% na presença de 1 mmol/L de MgSO₄ no sistema de reação.

A lipase obtida por *Geotrichum sp.* foi purificada 16,5 vezes através de fracionamento com sulfato de amônia e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50. A enzima apresentou atividade ótima na faixa de pH 5-8 a 45°C (Macêdo, 1997 b).

Mendieta (1999) utilizando coluna hidrofóbica de butyl Sepharose equilibrada com tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 adicionado de 2 mol/L de NaCl, purificou lipase de *Geotrichum sp.* A eluição foi feita com o mesmo tampão sem o sal. Os resultados obtidos de recuperação e fator purificação foram de 68% e 39 vezes respectivamente.

Lipase de *Ophistoma piliferum* foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Octyl Sepharose, seguido de cromatografia de troca iônica. Foram obtidas duas diferentes lipases. A lipase presente em maior quantidade apresentou peso molecular de 60KDa e pI igual a 3,79; enquanto a fração minoritária apresentou 55 KDa e pI de 3,60. Verificou-se que a atividade hidrolítica da enzima sobre p-nitrofenilbutirato (C4) e p-nitrofenilestearato (C18) era igual, um resultado não esperado. (Brush *et al.*, 1999)

Lipase de *Chromobacterium viscosum* foi fracionada utilizando polipropileno Sepharose gel. Foram estudadas a influência da composição fase móvel na etapa de adsorção e observou-se que a adsorção aumentava com o aumento da força iônica na fase móvel. A total retenção da enzima foi obtida com uma concentração de 20% p/v de sulfato de amônio em tampão fosfato. A dessorção foi realizada com a diminuição da força iônica do tampão. (Diogo et al., 1999).

Burket et al. (2001) realizaram a caracterização parcial da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meio sintético contendo peptona e óleo de soja. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 7,0 e 37°C. A estabilidade térmica da enzima foi relativamente baixa, com uma meia-vida de 3,6 h (37°C e pH 7,0) e a atividade enzimática foi quase totalmente inibida pela presença de íons Cu^{2+} e Ag^+ e, parcialmente inibida, pela presença de Fe^{2+} e Zn^{2+} .

A lipase de *Aspergillus carneus* foi purificada por cromatografia de interação hidrofóbica obtendo-se um fator de purificação de 24 vezes e uma recuperação da atividade de 38%. A enzima apresentou pH e temperatura ótimos de 9,0 e 37°C, respectivamente. Foi estável na faixa de pH 8 a 10 por 24 horas e por 5 minutos à temperatura de 70°C. (Saxena et al., 2003).

A produção em larga escala de uma lipase lissômica ácida recombinante obtida de *Schizosaccharomyces pombe* foi realizada por sistema de batelada alimentada e a enzima obtida foi purificada em duas etapas, utilizando cromatografia de interação hidrofóbica, seguida de cromatografia de troca aniônica. A enzima purificada apresentou peso molecular de 90 a 150 kDa e atividade específica de 300 U/mg. (Ikeda et al., 2004).

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

Fluxograma das etapas do trabalho

1ª. Etapa – Estudo das condições de obtenção do inóculo (capítulo IV)



Estudo para determinação da quantidade e idade de inóculo.

2ª. Etapa – Otimização dos meios de fermentação utilizando resíduos industriais (capítulo V)



Planejamentos experimentais com cinética de fermentação para determinação dos meios otimizados com diferentes fontes de nitrogênio (meio 1 – Prodex-lac® e meio 2 – água de maceração de milho).

3ª. Etapa – Produção da enzima em reator do tipo *air-lift* (capítulo VI)



Estudo da aeração (1,0 a 2,5 vvm) para produção de lipase, com ambos os meios otimizados.

4ª. Etapa – Produção da enzima em reator de mistura (capítulo VI)



Produção da enzima em reator de mistura (1,0 vvm e 300 rpm) para comparação da performance em relação ao reator do tipo *airlift*, com ambos os meios otimizados

5ª. Etapa – Estudo da etapa de *up stream* - clarificação do substrato (capítulo VII)



Estudo da clarificação prévia da água de maceração de milho para produção da lipase e ajuste da concentração ótima desse substrato.

6ª. Etapa – Purificação da enzima (capítulo VII)



Estudo da purificação da lipase obtida com ambos os meios otimizados por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)

7ª. Etapa – Caracterização bioquímica da enzima (capítulos VIII e IX)



Caracterização parcial da lipase bruta e determinação do pH e temperatura ótimos da lipase purificada obtidas com ambos os meios otimizados

O fluxograma apresentado acima apresenta de forma esquemática as etapas realizadas durante o trabalho. Cada etapa apresentada está relacionada com o capítulo na qual encontra-se descrita nesta dissertação. A primeira etapa está no capítulo IV que descreve a obtenção de melhores condições de obtenção do inóculo. O capítulo V apresenta a etapa de otimização da composição dos meios de fermentação e o capítulo VI traz os resultados das etapas 3^a. e 4^a. do estudo da produção da lipase em reatores de bancada. O estudo de up stream e purificação aparece relatado no capítulo VII e a caracterização enzimática é objeto de discussão dos capítulos VIII e IX.

Microrganismo

Geotrichum candidum NRRLY-552 gentilmente cedido pela Agricultural Research Service Collection, armazenado em meio ágar Yeast Malt (3 g/L de extrato de levedura, 3g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose e 30g/L de ágar) a 4°C foi escolhido para o desenvolvimento do projeto de produção de lipase.

Obtenção do inóculo para produção de lipase por *Geotrichum candidum*

Ensaio para determinação da quantidade de inóculo

O microrganismo armazenado em ágar Yeast Malt foi ressuspendido com 1,0 mL de água estéril e transferido para uma placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura. Esta placa foi incubada por 48 horas a 30°C sem agitação. Em todos os ensaios realizados neste trabalho este procedimento foi adotado como primeira etapa do processo de obtenção de inóculo.

No primeiro teste para determinação da quantidade de inóculo áreas circulares de 1,54 cm² (d = 1,4 cm) foram retiradas da placa contendo o microrganismo e transferidas para um tubo de ensaio contendo meio de inóculo (5,0% de peptona; 0,1% de nitrato de sódio; 0,1% de sulfato de magnésio e 1,0% de óleo de soja). Neste teste foram realizados quatro ensaios utilizando 1, 2, 3 e 4 áreas circulares, respectivamente. Os tubos de ensaio foram incubados por 24 horas a 30°C e 250 rpm. Após incubação o conteúdo de cada tubo foi transferido para erlenmeyers de 500 mL com 100 mL do meio de crescimento e esses foram novamente incubados por 24 horas a 30°C e 250rpm. A fermentação foi realizada

com meio de fermentação (5,0% de peptona; 0,1% de nitrato de sódio; 0,1% de sulfato de magnésio e 1,0% de óleo de soja) transferindo-se 10% (v/v) de inóculo para o meio de fermentação. A resposta analisada foi a atividade lipolítica durante a fermentação.

O segundo teste para determinação da quantidade de inóculo avaliou o volume de meio de inóculo utilizado (50 a 300mL) e o diâmetro da área circular contendo o microrganismo adicionada ao meio de inóculo (1,5 e 1,0 cm), totalizando 12 ensaios. Neste caso, a resposta analisada foi a atividade lipolítica durante o tempo de incubação de inóculo. A partir desse teste, o inóculo foi realizado em apenas dois estágios (crescimento em placa e incubação em meio líquido em erlenmeyer) ao contrário do primeiro no qual foi realizado um estágio a mais (incubação em meio líquido em tubo de ensaio).

O terceiro teste para determinação da quantidade de inóculo foi idêntico ao segundo com a redução do número de ensaios. Analisou-se as variáveis volume de inóculo (50 e 100 mL) e diâmetro da área circular (1,5 e 1,0 cm).

Ensaio para determinação do tempo de incubação do inóculo.

O volume de inóculo e o diâmetro da área circular foram definidos em 100 mL e 1,0 cm, respectivamente. Na sequência foram realizados quatro ensaios para escolha do melhor tempo de incubação de inóculo. Os ensaios foram realizados com os dois estágios de inóculo (crescimento em placa e incubação em meio líquido) conforme descrito no sub-item anterior, seguido do processo fermentativo. Avaliou-se os tempos de incubação de inóculo de 15, 24, 36 e 48 horas. A atividade lipolítica durante a fermentação foi a resposta analisada.

Análise do efeito da padronização do inóculo: incremento na atividade lipolítica e reprodutibilidade dos resultados

A análise dos efeitos da padronização do inóculo sobre o processo fermentativo foi realizada com a comparação entre dois planejamentos experimentais fracionários 2^{4-1} , com as variáveis independentes concentração de peptona (3,0 a 7,0%), de nitrato de sódio (0 a 0,2%), de sulfato de magnésio (0 a 0,2%) e óleo de soja (0,5 a 1,5%). O primeiro planejamento foi realizado antes da padronização do inóculo e o segundo, após a padronização. A resposta analisada foi a atividade lipolítica durante a fermentação.

Comparou-se o incremento da atividade lipolítica em decorrência da mudança do procedimento de inóculo em cada ensaio.

A reprodutibilidade dos resultados foi avaliada com um teste de cinética de fermentação com 4 ensaios realizados nas mesmas condições (5,0% de peptona; 0,1% de nitrato de sódio; 0,1% de sulfato de magnésio; 1,0% de óleo de soja; pH inicial de 7,0; 30°C e 250 rpm). Avaliou-se a atividade lipolítica média e o desvio padrão para cada tempo de fermentação amostrado (6 a 96 horas).

Estudo da composição dos meios de fermentação

O estudo da composição dos meios de fermentação foi realizado com a utilização de dois resíduos industriais – Prodex-lac[®] (hidrolisado protéico) e água de maceração de milho. Os meios escolhidos foram anteriormente testados por Burkert (2003).

A primeira etapa do processo consistiu na realização de um planejamento experimental fracionário 2^{4-1} para cada meio escolhido, para selecionar as variáveis significativas do processo. Para o meio contendo Prodex-lac[®] (meio 1) foram avaliadas as variáveis independentes concentração de Prodex-lac[®] (1,0 a 7,0%), de nitrato de sódio (0 a 0,2%), de sulfato de magnésio (0 a 0,2%) e óleo de soja (0,5 a 1,5%) e para meio contendo água de maceração de milho (meio 2), concentração de água de maceração de milho (5 a 15%), de cloreto de amônio (0 a 1%), Prodex-lac[®] (0,5 a 3,5%) e óleo de soja (0,4 a 1,0%).

Com os resultados obtidos nos planejamentos fracionários foram selecionadas as variáveis estatisticamente significativas em cada um dos meios para a realização dos planejamentos experimentais completos. Para o meio 1, as variáveis significativas foram concentração de Prodex-lac[®] e de óleo de soja, estudadas agora nas faixas de 1,0 a 5,0% e de 0,2 a 1,0%, respectivamente. Já para o meio 2, selecionou-se as variáveis concentração de água de maceração de milho e de óleo de soja, analisadas nas faixas de 2,0 a 10% e de 0,2 a 1,0%, respectivamente.

Com etapa dos planejamentos experimentais completos foi possível a obtenção de um modelo empírico que representasse a produção da lipase tanto para o meio 1 como para o meio 2. A partir dos modelos foi obtida a condição ótima de obtenção da enzima para cada meio. As condições otimizadas do meio de fermentação para produção da enzima foram utilizadas para as etapas posteriores do trabalho.

Produção da enzima em reator do tipo *airlift*

Com os meios otimizados obtidos na primeira etapa do processo, prosseguiu-se o estudo da produção de lipase com a utilização de reatores de bancada. O foco desta etapa do trabalho foi a utilização do bioreator do tipo *airlift* para produção de lipase utilizando o *Geotrichum candidum*, que é um fungo imperfeito filamentosos.

A escolha desse reator foi feita com base em estudos relatados na literatura (ver item 2.3) que utilizaram com sucesso reatores *airlift* para fermentações com fungos filamentosos. A opção de utilizar este reator pra produção de lipase baseou-se ainda no estudo realizado anteriormente por Burkert (2003), no qual a comparação dos resultados de atividade lipolítica e produtividade foram melhores no reator *airlift* do que em reator de mistura convencional.

O estudo foi realizado com os dois meios previamente otimizados (**meio 1:** 3,5% de Prodex-lac[®] e 0,7% de óleo de soja; **meio 2:** 8,0% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja) nas condições de aeração de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 vvm. As fermentações foram realizadas em reator do tipo *airlift* com pH inicial do meio igual a 7,0 e temperatura de produção de 30°C. A atividade enzimática, produtividade, pH do meio de fermentação e o consumo de oxigênio ao longo do tempo foram as respostas analisadas no processo.

Produção da enzima em reator de mistura

Para efeito de comparação a produção da enzima foi realizada em reator de mistura, com as condições otimizadas por Burkert (2005), que obteve uma melhor produção e melhor produtividade de lipase de *Geotrichum candidum* nas condições de 300 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração, pH inicial de 7,0 e temperatura de 30°C. As respostas avaliadas neste caso foram as mesmas escolhidas para o reator *airlift*.

Estudo da etapa de *up stream* (clarificação prévia do substrato)

A utilização de resíduos industriais neste projeto poderia comprometer a etapa de purificação da enzima, uma vez que os substratos contêm diversas impurezas que podem danificar ou obstruir a coluna de purificação. Desta forma, foi realizado um estudo de clarificação prévia da água de maceração de milho para produção da lipase.

A técnica de clarificação escolhida foi a realizada por Treichel (2004), que consiste em misturar o substrato a ser clarificado com carvão ativo. A água de maceração de milho (já na concentração a ser utilizada na fermentação) foi misturada com 8,0% de carvão ativo e a mistura foi submetida a tratamento a 65°C e 150 rpm por 1 hora. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração a vácuo por duas vezes. Os outros componentes do meio foram adicionados após a clarificação da água de maceração de milho.

Foram avaliadas as concentrações de 8 a 15% de água de maceração de milho clarificada para produção da lipase. Esta alteração na concentração do substrato em relação ao meio otimizado deve-se ao fato de que a clarificação além de remover impurezas, também pode retirar componentes que contribuem para a produção da enzima, daí a necessidade de se fazer um ajuste nos valores da concentração do substrato clarificado em relação ao substrato bruto.

As fermentações foram realizadas em frascos agitados a 30°C e 250 rpm, com pH inicial do meio de 7,0. A atividade lipolítica foi a resposta analisada e os dados foram tratados através de análise univariável utilizando o teste de Tukey (que avalia se há diferença estatisticamente significativa entre diferentes condições utilizadas através do valor da MDS – menor diferença significativa).

Purificação da enzima

A purificação da lipase obtida com ambos os meios industriais foi realizada através do método de cromatografia de interação hidrofóbica (HIC). A montagem foi feita com um sistema FPLC, com uma coluna de 1 cm de diâmetro interior e altura de leito de 5 cm, contendo Butyl Sepharose. A coluna contendo a resina foi lavada com tampão fosfato de sódio 0,01 mol/L pH 7,0 e equilibrada com tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 contendo 2 mol/L de cloreto de sódio.

A etapa de adsorção foi realizada com a amostra da enzima em tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 contendo NaCl. A concentração de NaCl no tampão utilizado na adsorção variou de 1,0 a 3,0 mol/L, de acordo com valores testados anteriormente por Mendieta (1999).

A dessorção da enzima foi realizada com a passagem do mesmo tampão sem a presença de NaCl. As amostras da enzima purificada foram analisadas quanto à atividade

lipolítica e ao teor de proteína solúvel, para calcular o fator de purificação e a recuperação da atividade.

Caracterização enzimática

Neste trabalho foi realizada a caracterização parcial das lipases bruta e purificada, obtidas com os dois substratos escolhidos. As características analisadas neste estudo foram temperatura e pH ótimos, estabilidade em relação à temperatura e ao pH, determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} e do tempo de meia vida, energia de ativação e desativação, estabilidade ao congelamento.

Temperatura e pH ótimos

Quatro planejamento experimentais completos 2^2 , com as variáveis independentes temperatura (27 a 47°C) e pH (6,0 a 8,0), foram realizados para determinação dos valores de temperatura e pH ótimo da reação enzimática. A emulsão reacional (tampão fosfato, goma arábica e óleo de oliva) foi preparada com diferentes valores de pH e a reação enzimática foi realizada a diferentes temperaturas.

Estabilidade térmica

A determinação da estabilidade em função da temperatura foi realizada incubando-se a enzima em solução tampão pH = 7,0 (pH ótimo determinado na etapa anterior) em diferentes valores de temperatura (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C). Amostras de cada ensaio foram coletas em diferentes intervalos de tempo (de acordo com a temperatura estudada) e tiveram a atividade enzimática determinada de acordo com Freire *et al.* (1997 b).

Nesses experimentos variou-se a temperatura em que a enzima fica incubada, mas todas as amostras coletadas foram analisadas a 37°C. Os resultados obtidos nesses experimentos foram utilizados para calcular a meia-vida ($t_{1/2}$) e a constante de desativação (K_d) para cada temperatura estudada.

Os valores de K_d podem ser calculados através da equação 3.1, considerando que a altas temperaturas a cinética de desnaturação enzimática é de 1ª. ordem e que o valor de K_d é função apenas da temperatura absoluta (T).

$$-\ln (V/V_o) = K_d \cdot t \quad (3.1)$$

onde: V = atividade enzimática em cada tempo de amostragem

V_o = atividade enzimática no tempo inicial ($t = 0$)

K_d = constante de desativação da reação enzimática

t = tempo de incubação da amostra

Na prática, os valores experimentais de K_d são determinados através do coeficiente angular do gráfico $-\ln(V/V_o)$ versus t.

A meia vida da enzima é o tempo necessário para que a enzima tenha sua atividade reduzida pela metade, ou seja, $V = 0,5V_o$. Sendo assim, a partir da equação 3.1., substituindo-se o termo V, obtém-se a equação 3.2. para o cálculo da meia vida da enzima.

$$t_{1/2} = - \ln (0,5)/K_d \quad (3.2)$$

onde: $t_{1/2}$ = meia vida da enzima

K_d = constante de desativação da reação enzimática

Energia de ativação (E_a) e energia de desativação (E_d)

O cálculo da energia de ativação foi realizado utilizando alguns pontos do estudo da temperatura ótima (27, 37 e 47°C) e com pontos obtidos a 30 e 44°C, todos utilizando meio reacional com pH igual a 7,0. Com os dados obtidos construiu-se o gráfico $-\ln(V/V_o)$ versus $1/T$. A partir do coeficiente angular do gráfico, obteve-se a energia de ativação através da equação de Arrhenius linearizada (eq. 3.3).

$$- \ln (V/V_o) = E_a/RT \quad (\text{eq. 3.3})$$

onde: V = atividade enzimática na temperatura analisada

V_o = atividade enzimática na temperatura de referência ($T = 37^\circ\text{C}$)

E_a = energia de ativação da reação enzimática

R = constante dos gases perfeitos

T = temperatura absoluta

A energia de desativação da reação enzimática (E_d) foi determinada a partir dos dados do estudo da estabilidade térmica. A partir do coeficiente angular do gráfico $-\ln(K_d)$ versus $1/T$ e utilizando a equação 3.4. determina-se o valor da energia de desativação (E_d).

$$\ln K_d = \ln K - E_d/RT \quad (\text{eq. 3.4})$$

onde: K_d = constante de desativação da reação enzimática a uma dada temperatura.

K = constante de desativação da reação enzimática na temperatura de referência.

E_d = energia de desativação da reação enzimática

R = constante dos gases perfeitos

T = temperatura absoluta

Estabilidade em relação ao pH

A determinação da estabilidade em função do pH foi realizada com incubação à temperatura de 30°C, a mesma utilizada anteriormente por Burkert (2003). Foram escolhidos os valores de pH 6,0; 7,0 e 8,0 para o estudo da estabilidade. As amostras foram coletadas em diferentes tempos de incubação e a atividade enzimática determinada segundo Freire et al. (1997 b) na temperatura de 37°C. Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo da meia vida de enzima em função do pH de incubação.

Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}

A determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} foi realizada variando-se a concentração do substrato para a reação enzimática (óleo de oliva). A faixa escolhida para determinação das constantes cinéticas foi de 8 a 100 g/L de óleo de oliva adicionado ao meio reacional.

Para cada ensaio foi preparada uma emulsão reacional com uma concentração diferente de óleo de oliva, dentro da faixa escolhida. A emulsão foi utilizada para determinação da atividade enzimática de acordo com o método descrito por Freire et al. (1997B).

Estabilidade ao congelamento

Amostras das enzimas obtidas foram congeladas e analisadas periodicamente para determinar a atividade residual em função do tempo de congelamento e a determinação do tempo de meia vida.

Métodos analíticos

Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o método descrito por Freire et al. (1997 b). O método é baseado na titulação dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima lipase, presente no caldo fermentado bruto, sobre os triglicerídeos de óleo de oliva emulsionados em goma arábica.

Em frascos de 100 mL são adicionados 19 mL de emulsão (5% de goma arábica e 5% de óleo de oliva) em tampão fosfato 100mM pH 7,0. A esta mistura é adicionado 1 mL do caldo fermentado contendo a enzima incubando-se 30 minutos a 37°C. A reação é paralisada com adição de 20 mL de solução acetona:etanol 1:1 v/v e os ácidos graxos liberados são titulados com solução de NaOH 0,05 N até pH final 11 em titulador automático Mettler Toledo DL50. Uma unidade de atividade de lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

Para determinação da temperatura e pH ótimos da enzima, a metodologia de análise foi diferente em relação à citada por Freire et al. (1997 b), pois a temperatura de análise da atividade enzimática variou na faixa de 27 a 47°C e o pH do meio reacional na faixa de 6,0 a 8,0. A mesma faixa de temperatura foi utilizada para determinação da energia de ativação da enzima (E_a), mas neste caso, o pH do meio reacional foi sempre igual a 7,0.

Quanto a determinação das constantes cinéticas K_m e $V_{\text{máx}}$, em relação a metodologia descrita acima, foi modificada a concentração de óleo de oliva utilizado, para na faixa de 8 a 100 g/L (0,8 a 10% óleo de oliva).

Determinação do pH do meio de fermentação

O pH do meio de produção foi determinado através da leitura direta do pH das amostras em pHmetro Mettler Toledo 320.

Determinação do teor de proteína

A determinação da concentração de proteína solúvel foi realizada pelo método descrito por Lowry et al. (1959).

Determinação de oxigênio dissolvido (OD)

O teor de oxigênio dissolvido (OD) foi determinado por leitura direta através de eletrodo de oxigênio acoplado aos fermentadores.

CAPÍTULO IV

ELUCIDATION OF THE EFFECTS OF INOCULUM SIZE AND AGE BY OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY *Geotrichum* *candidum*

Rafael Resende Maldonado, Janaína Fernandes Medeiros Burkert, Lúcia Durrant, Francisco
Maugeri and Maria Isabel Rodrigues

* *Dept of Food Engineering, FEA – University of Campinas, Campinas, SP, CEP: 13083-970, CP 6121, Brazil*

Telephone number: 55-19-37884052

Fax number: 55-19-37784024

bel@fea.unicamp.br

Key words: *inoculum size, factorial design, lipase, Geotrichum candidum*

Artigo elaborado para submissão à análise da revista *Enzyme and Microbial*
Technology

ABSTRACT

Lipases are extremely versatile enzymes that are able to catalyze a large number of reactions. Lipases are produced by a variety of microorganisms including bacteria, filamentous fungi and yeasts. Fungi are preferred for industrial production because they produce extracellular lipases. Lipases have been the subject of investigation over the last few years and it is important to obtain the best production conditions (composition of culture medium, aeration, agitation, temperature and pH). Furthermore, fungi are pluricellular that can cause variations amongst experiments, which can be prejudicial in the production of inocula with the same physiological conditions. In addition, variations in the inoculum have distinct influence on the results and reproducibility of process. The aim of this work was to study the inoculum size and age for lipase production by *Geotrichum candidum* NRRLY-552 that would enable the optimization of lipase production. The optimized conditions were an inoculum size of 0.79 cm² (circular area containing the spores), added to 100 mL of culture medium and an inoculum age of 15 hours. These conditions reduced the experimental error and resulted in a five times improvement in lipase activity. Optimization of the inoculum conditions possibilitied to continue the study of the lipase production optimization by *G. candidum* [1].

INTRODUCTION

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, E.C. 3.1.1.3) are enzymes with considerable physiological significance and industrial potential. Lipases catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to glycerol and free fatty acids. In contrast to esterases, lipases are only activated when adsorbed at an oil/water interface [2]. A real lipase can split emulsified esters of glycerin and long-chain fatty acids such as triolein and tripalmitin.

Lipases have promising applications in organic chemical processing, detergent formulations, synthesis of biosurfactants, the oleochemical industry, the dairy industry, the agrochemical industry, paper manufacture, nutrition, cosmetics and pharmaceutical processing. The development of lipase-based technologies for the synthesis of novel compounds is rapidly expanding the uses of these enzymes [3].

Due to their wide-ranging significance, lipases remain a subject of intensive study [4,5,6] Research on lipases is focused particularly on their structural characterization, elucidation of action mechanisms, kinetics, sequencing and cloning of lipase genes, and general performance characterization [4, 6, 7]. Recently other important factors concerning the efficient production and application of lipases have been studied, such as the development of lipase bioreactor systems and the optimization of up and down streams.

Fungi are preferred for the industrial production of lipase because they produce extracellular lipases, which facilitate their separation from the fermentation medium. The fungus *G. candidum* has been reported to be a potent lipase producer and factors affecting lipase production by this strain have been optimized, seven variables having been found to be important, i.e., pH, temperature, cultivation time, salt concentration and % of carbon and nitrogen in the medium [8, 9,10,11]

The development and management of the inoculum through various production stages has a definite effect on the subsequent performance and economics of the process. In commercial industrial fermentation processes, it is well known that the age and density of the inoculum used directly influences the duration of the lag phase, specific growth rate, biomass yield, sporulation and quality of the final product, and hence the production cost [12,13].

The effect of inoculum age and size on enzyme production has been investigated recently. The importance of these studies is considerable when using fungi in enzyme productions, because they are pluricellular organisms that can make homogenization of the inoculum difficult and consequently modify the enzyme activity and reproducibility of the results.

The production of lipase by *Penicillium cyclopium* using response surface methodology was studied in two papers [14, 15] and the results showed that the three most important factors were substrate concentration, pH and inoculum size. The optimal conditions for high lipase production were 1.0% substrate (corn steep), 3,200 spores/mL, initial pH of 5.0, temperature of 25°C and 120 rpm agitation.

The inoculum size influences the morphology of *Ceratocystis ulmi*, but was not influenced by the inoculum spore type, spore age, temperature, pH, oxygen availability, trace metals, sources of sulfur and phosphorous, concentrations of glucose and proline or the

addition of adenosine, reducing agents, methyl donors, amino sugars, fatty acids or carbon dioxide. However, an unknown quorum-sensing factor excreted by the growing cells was modifying the morphology of the mycelia. The authors concluded that the effect of inoculum size is a manifestation of a quorum-sensing system that is mediated by an excreted extracellular molecule, and they suggested that this was characteristic of a dimorphic fungus. [16].

A two-stage inoculum system was used to investigate the effects of inoculum age and size on the production of surfactin by *Bacillus subtilis*. This study focused on the elucidation of the individual, cumulative and interactive effects of two of the above parameters. The maximum relative surfactin concentration was obtained using a primary inoculum age and size of 56h and 5.5% (v/v) and secondary inoculum of 4.5h and 9.5% (v/v), respectively. The results showed a strong interaction between the primary and secondary inoculae and a maximum relative surfactin concentration of 58 CMC⁻¹ (or 1.3 g.L⁻¹) was obtained. [17].

Thus the aim of this study was to investigate the influence of inoculum size and age on lipase production by *G. candidum* NRRL Y-552, allowing for an increment in lipase activity and a reduction in the variability of the results.

MATERIAL AND METHODS

Effect of inoculum size

The first test used to elucidate the effects of the inoculum on lipase production used a different procedure to that used at the end of the study. *G. candidum* was cultivated in Petri dishes containing malt extract agar (3 g/L malt extract, 3 g/L yeast extract, 5 g/L peptone (Difco, Sparks, USA), 10 g/L glucose (Ecibra, São Paulo, Brazil) and 30 g/L agar) for 48 hours at 30°C. One to four circular 1.54 cm² areas (1.4 cm in diameter) were cut out, transferred to culture tubes containing 10 mL of malt extract, incubated for 24 hours at 30°C and transferred to 500 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of a medium containing 5.0% of peptone, 0.1% of NaNO₃ (Ecibra, São Paulo, Brazil), 0.1% of MgSO₄ (Ecibra, São Paulo, Brazil) and 1.0% of soy oil (Soya, Brazil), with an initial pH of 7.0. These flasks were incubated for 24 hours at 30°C and 250 rpm and 10% (v/v) of the resulting solution was used as the inoculum for lipase production using a medium with the

same composition as the inoculum medium. Fermentation was carried out at 30°C and 250 rpm for about 72 hours. Lipase activity and pH were determined during fermentation.

In the second test concerning inoculum size, two variables were studied, i.e., inoculum diameter (1.0 and 1.4 cm) and the inoculum medium volume of (50 to 300 mL) to determine the best inoculum size. Circular areas of solid medium containing spores were cut out and transferred directly to flasks containing inoculum medium. Lipase activity and pH were determined during the incubation time of the inoculum.

The best conditions obtained in the second test, i.e., inoculum diameter (1.0 and 1.4 cm) and the inoculum medium volume of (50 and 100 mL), were used in the third test to obtain the best conditions of inoculum size. The third test was the same as the second test with a smaller number of trials.

Effect of Inoculum Age

After the best inoculum size for lipase production by *G. candidum* had been determined, experiments were run to determine the influence of inoculum age on lipase activity. The inoculum was prepared as described above and flasks containing the inoculum medium incubated for 15, 24, 36 or 48 hours and used to inoculate the fermentation medium. Lipase activity and pH were determined during the fermentation time.

Lipase production

The influence of inoculum conditions (inoculum size and age) on lipase production was determined using two 2^{4-1} experimental designs. The independent variables studied were the concentrations of peptone (3.0 to 7.0%), MgSO_4 (0 to 0.2%), NaNO_3 (0 to 0.2%) and soy oil (0.5 to 1.5%). The first experimental design was performed using the initial inoculum procedure and the second experimental design with the best conditions for inoculum size and age determined in the initial study. The results of the two experimental designs were compared, analyzing the increment in lipase activity.

The best conditions obtained in the second experimental design were used in a test to determine the fermentation kinetics to evaluate the influence of inoculum size and age on the reproducibility of the results obtained for lipase activity.

Lipase assay

Lipase activity was determined by a micrometric assay with 0.05M NaOH, using emulsified olive oil as the substrate. The reaction mixture consisted of 19 mL of an olive oil/ gum Arabic emulsion (5% olive oil and 5% gum Arabic) in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. This mixture was homogenized in a blender for 3 min and the enzyme reaction started by adding 1 mL of culture supernatant. The assay was carried out at 37°C and 200 rpm for 30 min and the reaction stopped by adding 20 mL of 1:1 acetone-ethanol (v/v). The amount of fatty acids produced was quantified by titration with 0.05 M NaOH using an automatic titration apparatus (Mettler DL21). One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1 μmol of fatty acid equivalents per minute under the conditions of the assay [18].

RESULTS AND DISCUSSION

Determination of inoculum size

As shown in figure 1 there was a decrease in lipase activity with increase in inoculum size (number of circular areas) during the fermentation time. After 47 hours of fermentation, 15.75 and 2.77 U/mL lipase activity were obtained when 1x 1.54 cm² and 4 x 1.54 cm², were used as inoculum, respectively. The lipase activity obtained with one circular area was about six times higher, suggesting that a smaller quantity of spores added to the same substrate concentration is better to obtain higher levels of lipase activity during fermentation. This fact could be related to a typical phenomenon found in mycology, self-inhibition of fungal spore germination. Many fungal spores exhibit a crowding effect [19, 20] in which the spores contain a prepackaged self-inhibitor that prevents germination under crowded conditions [16]. Another effect observed was that fungi with small inoculum sizes produced a transient mycelial stage with the mycelium length inversely proportional to the inoculum size [21]. This effect was also obtained in the production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C-30, in which the average dimension of pellet seems to be inversely proportional to the inoculum size [22]. The effects of self-inhibition and inoculum size could explain the results obtained in this work, in which small quantities of inoculum were propitious in obtaining a more effective inoculum for the fermentation process.

According to these results it was decided to use only one circular area of malt agar containing spores, but two different areas were chosen for the next test: 1.54 cm^2 (1.4 cm in diameter) and 0.79 cm^2 (1.0 cm in diameter), because the first analysis suggested that the smaller inoculum size could be more efficient in this process.

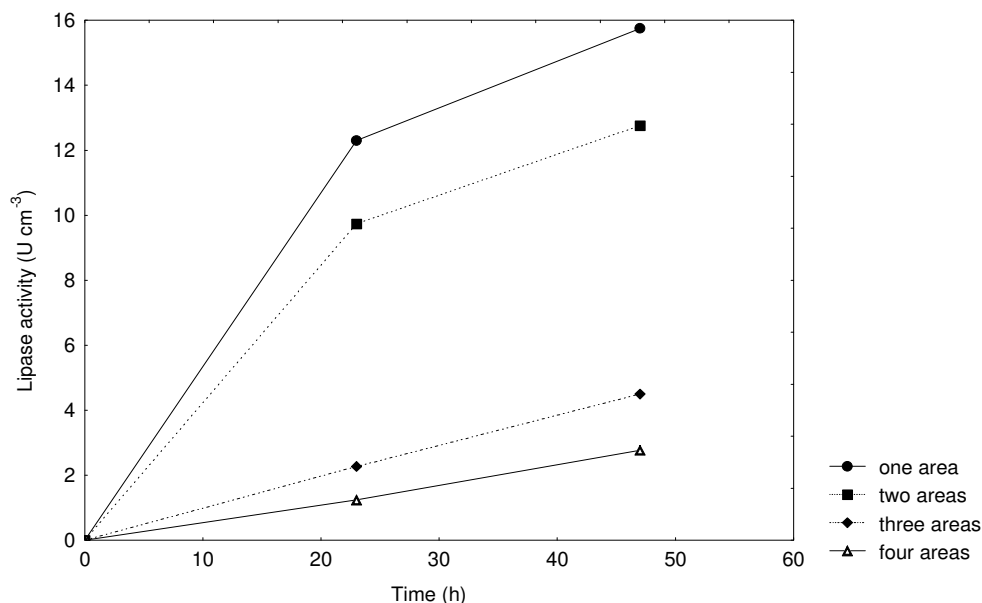


Figure 1 – Effect of inoculum size on lipase production by *G. candidum* in lipase activity (each area has 1.54 cm^2)

The results of the second test for inoculum size are shown in table 1. The highest activities were obtained with a circular area of 1.0 cm of diameter and 50 mL of inoculum medium (trial 1) and a circular area of 1.0 cm of diameter and 100 mL of inoculum medium (trial 2), where 7.53 and 7.74 U/mL were obtained after 24 and 48 hours of incubation time, respectively. The values obtained for lipase activity in this test were smaller than those obtained in the first test, because the lipase activity was determined during the inoculum incubation time and not during the fermentation time, as in the first test.

The second test showed that the conditions using a smaller quantity of spores produced better results for lipase activity, as in the first test. This result suggests that the hypothesis about the relation of quantity of spores inoculated and quantity of substrate in the medium is highly probable, i.e. the smaller the relation the greater the lipase activity. Similar results were observed by another author, as described above [21].

The test was not conclusive with respect to the volume of inoculum medium, but it suggests that the best condition is 50 or 100 mL. This is probably because oxygen transfer is more efficient when using a smaller volume of inoculum medium.

Table 1 - Results obtained in the second test for inoculum size

<i>Trial</i>	<i>Volume of inoculum medium (mL)</i>	<i>Circular areas diameter (cm)</i>	<i>Lipase activity (U/mL)</i>	
			<i>24 h</i>	<i>48 h</i>
1	50	1.0	7.53	4.01
2	100	1.0	2.62	7.74
3	150	1.0	3.83	4.02
4	200	1.0	3.12	3.37
5	250	1.0	2.93	3.33
6	300	1.0	3.60	4.83
7	50	1.4	4.73	0.21
8	100	1.4	4.49	3.05
9	150	1.4	4.23	3.34
10	200	1.4	3.27	2.95
11	250	1.4	2.09	2.71
12	300	1.4	1.16	2.48

Since the highest results for lipase activity were obtained with a circular area of inoculum of 1.0 or 1.4 cm in 50 or 100 mL of inoculum medium, these conditions were used to determine the effect of inoculum size on lipase activity.

As shown in table 2, the best lipase activity was obtained when the inoculum was made with a circular area of 1.0 cm diameter (0.79 cm^2 of area) in 100 mL of inoculum medium and incubated for 37 hours. In the production of xylanase by *Pleurotus ostreatus* SYJ042, the authors used the same methodology as used in this work, i.e., spore cultivation in a solid medium and transference of the circular areas to the inoculum medium. They obtained the same optimal circular area (0.79 cm^2) using four 0.5 cm diameter disks [23].

Table 2 – Results of the third test for inoculum size

Trial	Volume of inoculum medium (mL)	Circular area diameter (cm)	Lipase activity (U/mL)						
			6.0 h	12 h	18 h	24 h	29 h	37 h	42 h
1	50	1.0	0.0	0.0	0.0	3.10	3.98	4.81	8.49
2	100	1.0	0.0	0.0	0.24	2.64	4.61	13.20	12.09
3	50	1.4	0.21	0.09	0.15	3.74	5.15	6.82	8.70
4	100	1.4	0.84	0.0	0.36	4.32	4.91	8.90	7.66

Inoculum age

The next step in this research was to determine the influence of inoculum age on lipase activity. As shown in table 3, inoculae older than 15 hours resulted in higher lipase activity levels. The lipase activities and pH profile are shown in figure 2.

The inoculum age varied a lot depending to the process, cultivation conditions, composition medium, microorganism and other factors. The best condition for the inoculum age of *G. candidum* determined this work was shorter than in the other studies using different microorganisms. For example, an optimized inoculum age of 18 and 96 hours was obtained for the alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* [24] and *Bacillus* sp [25], respectively. The best inoculum age found using the two-stage inoculum of alpha-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* showed the best results with 28 hours of primary inoculum and 6 hours of secondary inoculum. [26]. The inoculum age of *Aspergillus niger* was better at 52.3, 60.5 and 52.5 hours for the production of polymethylgalacturonase, polygalacturonase and pectinlyase, respectively [27].

Table 3– Results of inoculum age test

Trial	Inoculum age (h)	Lipase activity (U/mL)				
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	15	13.90	17.19	15.80	16.78	5.37
2	24	10.90	10.72	11.82	10.83	7.81
3	36	3.05	4.61	7.17	5.44	0.52
4	48	1.99	4.91	4.36	3.41	3.04

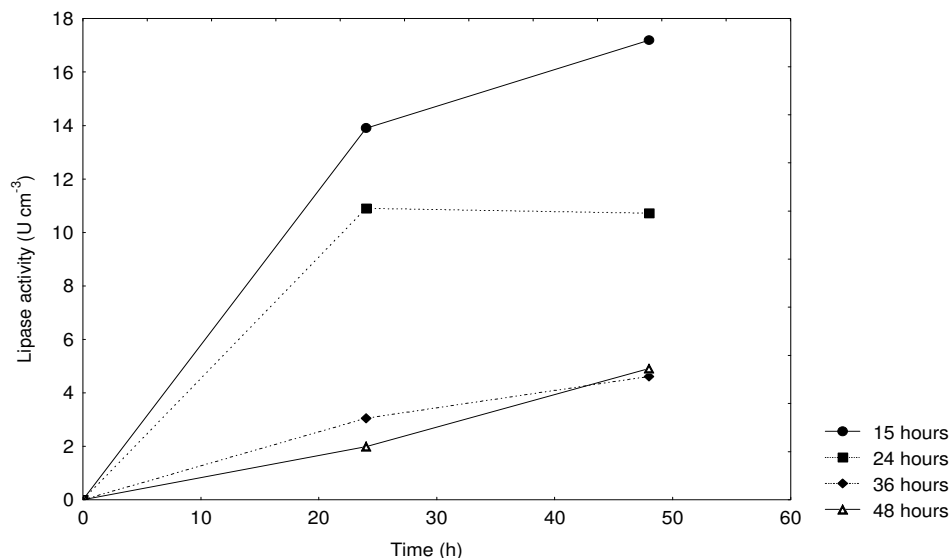


Figure 2 –Lipase activity during fermentation time in inoculum age test.

Comparison of lipase production using different inoculum procedures

Two 2^{4-1} factorial designs were applied to compare the initial inoculum procedure with the new conditions obtained in this work. The results are shown in table 4.

Table 4 – The results of the two factorial designs using different inoculum procedures

Trial	Peptone (%)	NaNO ₃ (%)	MgSO ₄ (%)	Soy oil (%)	Lipase activity after 48 hours	
					First factorial design	Second factorial design
1	3.0(-1)	0 (-1)	0 (-1)	0.5 (-1)	3.25	13.21
2	7.0(+1)	0 (-1)	0 (-1)	1.5 (+1)	2.56	18.01
3	3.0(-1)	0.2(+1)	0 (-1)	1.5 (+1)	2.77	7.78
4	7.0(+1)	0.2(+1)	0 (-1)	0.5 (-1)	1.05	5.00
5	3.0(-1)	0 (-1)	0.2(+1)	1.5 (+1)	2.71	3.43
6	7.0(+1)	0 (-1)	0.2(+1)	0.5 (-1)	2.16	6.69
7	3.0(-1)	0.2(+1)	0.2(+1)	0.5 (-1)	2.61	11.11
8	7.0(+1)	0.2(+1)	0.2(+1)	1.5 (+1)	2.93	13.97
9	5.0 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	1.0 (0)	2.84	21.87
10	5.0 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	1.0 (0)	1.57	14.43
11	5.0 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)	1.0 (0)	2.86	20.11

* Results obtained using the optimized inoculum conditions (one circular area of 0.79cm², 100 mL of inoculum medium and 15 hours of inoculum incubation).

As shown in table 4, the modification of the inoculum conditions resulted in a good increment in lipase activity, which ranged from 1.25 to 7.50 times. This result confirmed the fact that the inoculum size and age used were much better than the initial conditions, and were adequate for use with filamentous fungi such as *G. candidum*. This result is very interesting because it showed that experimental designs can be used to show up problems occurring in other phases not being directly analyzed. The small values obtained for lipase activity and the small differences between the values for lipase activity in the different treatments, suggest there were problems in the pre-fermentation, which should be studied before statistically optimizing the medium composition for lipase production.

The kinetics of fermentation was carried out to determine the lipase production profile during the fermentation time and to analyze for process reproducibility. Four trials were made under the same conditions at the central point of the experimental design (5% of peptone, 0.1% of sodium nitrate, 0.1% of magnesium sulfate and 1.0% of soy oil) with many samples during fermentation time. Fermentation was carried out at 30°C, 250 rpm and an initial pH of 7.0. The results are shown in table 5.

Table 5 – Results for fermentation reproducibility for lipase production by *G. candidum*

<i>Time (h)</i>	<i>Trial 1</i>	<i>Trial 2</i>	<i>Trial 3</i>	<i>Trial 4</i>	<i>Average</i>	<i>Standard</i>	<i>Standard</i>
	<i>(U/mL)</i>	<i>(U/mL)</i>	<i>(U/mL)</i>	<i>(U/mL)</i>	<i>activity</i>	<i>Error</i>	<i>Error</i>
					<i>(U/mL)</i>	<i>(U/mL)</i>	<i>(%)</i>
6.0	0.83	0	0.53	0	0.34	0.41	121
12	4.27	4.82	2.57	3.73	3.80	0.97	25.6
24	10.12	7.53	7.49	7.23	8.09	1.36	16.8
30	10.86	7.14	9.70	6.23	8.48	2.16	25.5
37	-	10.32	8.83	10.48	9.88	0.91	9.2
48	15.19	10.18	11.03	9.63	11.51	2.52	21.9
54	12.93	9.20	9.36	7.76	9.81	2.19	22.4
71	8.55	8.47	3.83	7.56	7.10	2.22	31.4
78	1.61	5.07	1.11	1.41	2.30	1.86	80.8
83	0.21	4.97	1.85	5.11	3.03	2.41	79.4
96	0.28	0	0.03	0	0.08	0.40	175

As shown in table 5, the inoculum conditions used reduced the variability of the results. Between 24 and 54 hours, when the highest levels for lipase activity were observed, the deviation in the relation of the average values was around 20%, which is a good result for fermentation using filamentous fungi. Such kinetics also produced a greater level of lipase activity than described in the literature. The average lipase activity after 48 hours (11.51 U/mL) was about twice the size of that obtained in another study with the same microorganism [28] and about five times bigger than previously obtained in this work, before modification of the inoculum size and age.

CONCLUSION

The conditions obtained in this work with respect to inoculum size and age contributed to the improvement of lipase production by *G. candidum* NRRL Y-552 and reduced the variability in the fermentation results. The optimized inoculum was obtained from a suspension of *G. candidum* spores in malt extract agar using 1.0 mL of distilled water. This suspension was incubated in solid yeast malt agar for 48 hours at 30°C. A circular area (0.79 cm²) was cut out and placed in an Erlenmeyer flask containing 100 mL of inoculum medium (5.0% of peptone, 0.1% of NaNO₃, 0.1% of MgSO₄ and 1.0% of soy oil) and incubated for 15 hours at 30°C and 250 rpm. 10% of this inoculum (v/v) was inoculated into the fermentation medium and fermentation carried out at 30° C and 250 rpm.

REFERENCES

1. Burkert, J.F.M.; Maldonado, R.R.; Maugeri, F. and Rodrigues, M.I.. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters, *J.Chem. Technol. and Biotechnol.* 2005, 80: 61-67.
2. Martinelle, M.; Holmquist, M. and Hult, K, 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Bioch. Bioph. Acta.* 1995, 1258: 272–276.
3. Liese, A.; Seelbach, K. and Wandrey, C. Industrial biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim. Editors, 2000.

4. Alberghina, L.; Schmid, RD. and Verger, R., *Lipases: structure, mechanism and genetic engineering*, VCH, Weinheim. Editors, 1991.
5. Bezzine, S.; Carriere, F.; Decaro, J.; Verger, R. and Decaro, A. Human pancreatic lipase: an exposed hydrophobic loop from the C-terminal domain may contribute to interfacial binding. *Biochem.* 1998, 25: 1846–1855.
6. Bornscheuer, UT. *Enzymes in lipid modification*, Wiley-VCH, Weinheim. Editor, 2000.
7. Sanchez, M.; Prim, N.; Pastor, J. and Diaz, P. Engineering of Baker's Yeasts, *E. coli* and *Bacillus* hosts for the production of *Bacillus subtilis* lipase. *Appl. Biotechnol. and Bioeng.* 2002, 78: 339-345
8. Hedrich, H.C.; Menge, F.S; Hecht, H-J and Schmid, R.D. Large-scale purification, enzymic characterization and crystallization of the lipase from *Geotrichum candidum*. *Enzyme Microb Technol.* 1991, 13:840-847.
9. Jacobsen, T. and Poulsen, O.M. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Lipids and Lipid Metabolism.* 1995, 13 (2):96-102.
10. Marcellino, N.; Beuvier, E.; Grappin, R.; Gueguen, M. and Benson, D.R. Diversity of *Geotrichum candidum* strains isolated from traditional cheesemaking fabrications in France. *Appl. Envir. Microbiol.* 2001, 67(10):4752-4759.
11. Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Priya, T.L.; Annadurai, G. and Anbu, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum* : conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 19(7): 681-689.
12. Monhaghan, M.M.; Gagliardi, S.L.; Streicher, A.L. and Demian, J.E. Culture preservation and inoculum development. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 1999: 29-48.
13. Stanburry, P.F.; Whitatker, J. and Hall, S.J. *Principles of Fermentation Technology* (chapter 6), second ed. 1995: 147-164
14. Vanot, G.; Deyris, V.; Guilhem, M.-C.; Luu, R.P.T. and Comeau, L.-C. Optimal design for the maximation of *Penicillium cyclopium* lipase production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 57:342-345.

15. Vanot, G.; Valérie, D.; Guilhem, M.-C.; Luu, R.P.T. and Comeau, L.-C. Maximizing production of *Penicillium cyclopium* partial acylglycerol lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 60:417-419.
16. Hornby, J.M.; Jacobitz-Kizzier, S.M.; McNeel, D.J.; Jensen, E.C.; Treves, D.S. and Nickerson, K.W. *Appl. and Envir. Microbiol.* 2004, 70 (3): 1356-1359.
17. Sen, R. and Swaminathan, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. *Biochem. Eng. J.* 2004, 21: 141-148.
18. Freire, D.M.; Teles, E.M.F; Bon, E.P.S; Lippel Sant'anna Jr, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997, 63: 409-421
19. Griffin, D.H. Fungal physiology. Willey-Liss. 1994. 2nd. ed.
20. Macko, V.; Staples, R.C.; Yaniv, Z. and Granados, R.R. Self-inhibitors of fungal spores germination. Willey.1976:73-100.
21. Kulkarai, R.K. and Nickerson, K.W. Nutritional control of dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Experim. Micol.* 191, 5 (2):148-154.
22. Domingues, F.C.; Queiroz, J.A.; Cabral, J.M.S. and Fonseca, L.P. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol.* 2000, 5-6: 394-401.
23. Qinnghe, C.; Xiaoyu, Y.; Tiangui, N.; Cheng, J. and Qiugang, M. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochem.* 2004, 39 (11): 1561-1566.
24. Beg, Q.K.; Sahai, V. and Gupta. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochem.* 2003, 39(2): 203-209.
25. Genckal, H. and Tari, C. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme Microb Technol.* Article in press.
26. Milner, J.A.; Martin, D.J. and Smith, A.. Two-stage inocula for the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Process Biochem.* 1997, 21(5):382-386.

27. Panda, T.; Naidu, G.S.N. and Sinha, J. Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. *Process Biochem.* 1999, 35(1-2): 187-195.
28. Baillargeon, M.W.; Bistline, R.G.; Sonnet, P.E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989. 30 (1): 92-96.

CAPÍTULO V

OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY *Geotrichum candidum* USING ALTERNATIVE NITROGEN SOURCES

Rafael Resende Maldonado, Eduardo Luiz Pozza, Fátima Aparecida Almeida Costa,
Francisco Maugeri and Maria Isabel Rodrigues.

Corresponding author: Maria Isabel Rodrigues

Affiliation: Department of Food Engineering - UNICAMP

Address: Department of Food Engineering - UNICAMP

Cidade Universitária Zeferino Vaz, –CEP: 13083-970 – C.P.6121 – Campinas – SP –
Brazil.

Fax number: (05519)3788-4027

Email: bel@fea.unicamp.br

Artigo elaborado para submissão à análise da revista *Bioresource Technology*

Abstract

Lipase production by microorganisms has been much studied in recent years. Different carbon and nitrogen sources are used for different types of microorganism. Yeasts are the most commonly used microorganisms since they are unicellular and easier to manipulate, but fungi are more interesting to bioprocess because they produce extracellular enzymes, which makes enzyme recovery from the fermentation medium easier. In this work lipase production by *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 was studied using with alternative nitrogen sources. Two substrates were chosen as nitrogen sources – yeast hydrolysate (Prodex-lac[®]) and corn steep liquor. These substrates were chosen because they have no important applications in industry, are cheap and contain high levels of nitrogen. Corn steep liquor was analyzed from 5 at 15% and yeast hydrolysate from 1 at 7% using a factorial design. In both cases soy oil was used as the carbon source and inducer of lipase production. This substrate is a good option, because soy oil is produced on a very large scale in many countries, especially in Brazil, and is cheaper than olive oil (more commonly used substrate for lipase production). The results showed that the optimal conditions for lipase production were 8% of corn steep liquor with 0.6% of soy oil (culture medium one) and 3.5% of yeast hydrolysate with 0.7% of soy oil (culture medium two). The maximum lipase activities obtained were, respectively, 17.0 and 24.0 U/mL, after 48 hours of fermentation.

Key words: lipase, corn steep liquor, yeast hydrolysate, soy oil, optimization, complex medium

1. Introduction

Lipase production is the aim of many studies reported in the literature. Different nutrient sources and innumerable types of microorganism are used for this enzyme production. Enzyme production is the first step in the study of an enzyme, and some factors may be observed in this process. In this case, one important factor is to try to obtain the highest level of enzyme production, but this is not necessarily sufficient for a good development of the other phases of the enzyme process. The costs of production and the

characteristics of the fermentation medium are very important to obtain an efficient process.

Alternative nutrient sources have been much explored in recent years, because they are of reduced cost and involve the reutilization of resources produced by industries, agriculture and other processes, important in the reduction of environmental problems concerning the destination of these sub products. Some studies reported in the literature have shown good results using non-conventional carbon and nitrogen sources.

Lactic acid production by *Enterococcus faecalis* RKY1 showed a 106% improvement in productivity and 138% improvement in cell weight on adding 15.0 g/L of corn steep liquor to the fermentation medium (Hurok *et al.*, 2005). Corn steep liquor was also used in the production of lipase by *Geotrichum* sp. using a factorial experimental design to obtain the best production conditions. Maximum lipase activity of 20 U/mL was obtained using 13% of corn steep liquor, 2.1% of ammonium nitrate and 0.6% soy oil (Burkert *et al.*, 2004). Glucose oxidase production by *Aspergillus niger* showed a 10% improvement when using corn steep liquor as the nitrogen source as compared to its production using a medium without this nutrient (Kona *et al.*, 2001). The production of α -amylase by *Aspergillus niger* was not influenced by the addition of 20mL/L corn steep liquor to the medium, but this substrate stimulated cell growth (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

The culture medium for the production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. was optimized using an experimental design and response surface methodology. The best production conditions were 160 g/L of sugar cane molasses, 20g/L of peptone and 15 g/L of yeast hydrolysate after 8 h incubation at 30°C (Kawagutti *et al.*, 2006).

The valorization of olive-mill wastewater (OMW) was also investigated as the substrate in the growth medium for the microbial production of extracellular lipase. *Geotrichum candidum* (NRRLY -552 and Y-553), *Rhizopus oryzae* (NRRL 6431), *Aspergillus oryzae* (NRRL 1988 and 495), *Aspergillus niger* (NRRL 334), *Candida cylindracea* (NRRL Y-17506) and *Penicillium citrinum* (NRRL 1841 and 3754, ISIRIM 118) were screened for this production. All the strains were able to grow on undiluted OMW and *Candida cylindracea* produced the highest lipase activity of 9.23 IU ml⁻¹ of medium supplemented with NH₄Cl (2.4 g L⁻¹) and olive oil (3.0 g L⁻¹), showing that OMW

is a good option for lipase production (D' Annibale et al., 2006). The same idea, i.e., adding value to agro-industrial residues, was reported in another paper (Mazzuti et al., 2006) in which inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* was studied using sugarcane bagasse, a residue with a high sugar concentration, as the support carbon source. Corn steep liquor was used as a nitrogen supplement.

Corn steep liquor was also used in the production of protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K, but in this case, the substrate inhibited the protease activity (Rahman et al., 2005). However, in a co-production of thermostable α - amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis*, corn steep liquor was the best nitrogen source (Konsula & Liankopoulou-Kyriakides, 2006).

2. Material and methods

2.1. Inoculum

The microorganism used was *Geotrichum candidum* NRRLY –552 and the inoculum was prepared from spores obtained from malt extract agar using 1.0 mL of distilled water. These spores were incubated on Yeast Malt Agar in a Petri dish for 48 hours at 30°C. A circular disk was then cut out and added to a flask containing the inoculum medium (5.0% peptone, 0.1% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ and 1.0% soy oil). This medium was incubated for 15 hours at 30°C and 250 rpm and 10% v/v of inoculum then transferred to the fermentation medium.

2.2. Optimized fermentation medium containing yeast hydrolysate

Two factorial designs were used to study lipase production from the yeast hydrolysate. A 2⁴⁻¹ fractional factorial design was first used, the independent variables being the concentrations of yeast hydrolysate (1.0 to 7.0%), sodium nitrate (0 to 0.2%), magnesium sulfate (0 to 0.2%) and soy oil (0.5 to 1.5%). The yeast hydrolysate used contained about 4.0% of total nitrogen. After analyzing the effect of the four variables in the fractional factorial design, two variables were selected and a Central Composite Rotatable Design (CCRD) used to analyze the concentrations of yeast hydrolysate between 1.0 and 5.0% and of soy oil between 0.2 and 1.0%. All fermentations were carried out at

30°C in 500 mL shaker flasks containing 100 mL of fermentation medium, with an initial pH of 7.0 and 250 rpm of agitation. Lipase activity and the pH at 24, 48 and 72 hours of fermentation were analyzed as the process responses.

2.3. Optimized fermentation medium containing corn steep liquor

Lipase production using corn steep liquor was analyzed in three sequential steps. First the lipase production using different nitrogen sources – corn steep liquor, ammonium chloride, yeast hydrolysate and peptone was investigated. After the preliminary trials, a 2^{4-1} fractional factorial design was applied with the following independent variables: the concentrations of corn steep liquor (5.0 to 15%), ammonium chloride (0 to 1.0%), yeast hydrolysate (0.5 to 3.5%) and soy oil (0.4 to 1.0%). The corn steep liquor used contained about 4.6% of total nitrogen. The second experimental design was applied using just two variables: the concentrations of corn steep liquor (2.0 to 10.0%) and soy oil (0.2 to 1.0%). The fermentations were carried out under the same conditions used in the medium optimization containing yeast hydrolysate.

2.5. Analytical methods

Lipase activity was measured using a titrimetric assay, titrating with 0.05M NaOH, the substrate being emulsified olive oil. The reaction mixture consisted of 19 mL of an olive oil/ gum Arabic emulsion (5% olive oil and 5% gum Arabic) in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. This mixture was homogenized in a blender for 3 min and the enzyme reaction started by adding 1 mL of culture supernatant. The assay was carried out at 37°C and 200 rpm for 30 min. The reaction was then stopped by adding 20 mL of acetone-ethanol 1:1 (v/v), and the amount of fatty acids produced titrated with 0.05M NaOH to pH 11.0 using an automatic titration apparatus (Mettler DL21). One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1 μ mol of fatty acid equivalents per minute under the assay conditions ([Freire *et al.*, 1997](#)). The values for pH were obtained using a pHmeter.

3. Results and discussion

3.1. Optimized fermentation medium containing yeast hydrolysate

Lipase production using yeast hydrolysate as the nitrogen source was studied in a 2^{4+1} fractional experimental design. Table 1 shows the values used in this first experimental design and the results obtained.

Table 1 – Fractional factorial design for lipase production using yeast hydrolysate as the nitrogen source

<i>Trial</i>	<i>Yeast hydrolysate (%)</i>	<i>NaNO₃ (%)</i>	<i>MgSO₄ (%)</i>	<i>Soy oil (%)</i>	<i>Lipase activity (U/mL)</i>		
					<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>	<i>73 hours</i>
1	1.0(-1)	0(-1)	0(-1)	0.5(-1)	8.77	4.35	0.00
2	7.0(+1)	0(-1)	0(-1)	1.5(+1)	9.34	18.74	13.17
3	1.0(-1)	0.2(+1)	0(-1)	1.5(+1)	1.78	0.09	0.00
4	7.0(+1)	0.2(+1)	0(-1)	0.5(-1)	8.57	14.21	8.14
5	1.0(-1)	0(-1)	0.2(+1)	1.5(+1)	6.65	0.93	1.35
6	7.0(+1)	0(-1)	0.2(+1)	0.5(-1)	7.52	18.97	0.72
7	1.0(-1)	0.2(+1)	0.2(+1)	0.5(-1)	7.31	0.00	0.00
8	7.0(+1)	0.2(+1)	0.2(+1)	1.5(+1)	8.93	11.44	16.28
9	4.0(0)	0.1(0)	0.1(0)	1.0(0)	10.16	19.09	18.03
10	4.0(0)	0.1(0)	0.1(0)	1.0(0)	12.57	23.20	9.36
11	4.0(0)	0.1(0)	0.1(0)	1.0(0)	11.57	22.00	5.86
12	4.0(0)	0.1(0)	0.1(0)	1.0(0)	11.27	20.33	2.21
13	4.0(0)	0.1(0)	0.1(0)	1.0(0)	10.28	20.70	3.78

* Codified values in parenthesis.

Table 2 – Effect on lipase activity after 48 hours of fermentation

<i>Variable</i>	<i>Effect (U/mL)</i>	<i>Standard error</i>	<i>t-value (8)</i>	<i>p-value</i>
Medium	13.39*	0.44*	6.14	<0.01*
Yeast hydrolysate	14.50*	1.11*	2.61	0.03*
NaNO ₃	-4.31	1.11	-0.78	0.46
MgSO ₄	-1.51	1.11	-0.27	0.79
Soy oil	-1.58	1.11	-0.28	0.78

* Statistically significant values at $p < 0.10$.

The results obtained in this experimental design showed the principal effects of the four variables analyzed on lipase activity after 48 hours of fermentation (process time when the maximum lipase activity was verified). The yeast hydrolysate concentration showed a highly positive effect on lipase activity of 14.50 U/mL as the concentration increased from 1.0 to 7.0%.

The best results were obtained with the central point trials using 4.0% of yeast hydrolysate and thus concentrations around this value were studied in the next factorial design. The effects of the other three variables were not significant at $p < 0.10$ so the values of these were maintained low values. Sodium chloride and magnesium sulfate were excluded from the fermentation medium because they were absent at level -1 (0%). The soy oil concentration was also not significant so its range was reduced from 0.2 to 1.0%. This reduction is important in industrial applications, where small variations in concentration represent a considerable decrease in the amount of substrate used and consequent reduction in medium costs. In another study using peptone as nitrogen source, it was also observed that only the nitrogen source had a significant effect on lipase production by *Geotrichum candidum* (Burkert *et al.*, 2002). The results obtained in the fractional factorial design were used to choose the significant variables for this process and to define the concentrations for the next factorial design. The concentrations of yeast hydrolysate and soy oil were studied using a CCRD as shown in table 3.

Table 3– Central composite rotatable design for lipase production using yeast hydrolysate as the nitrogen source

<i>Trial</i>	<i>Yeast hydrolysate (%)</i>	<i>Soy oil (%)</i>	<i>Lipase activity (U/mL)</i>		
			<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>	<i>72 hours</i>
1	1.58(-1)	0.32(-1)	10.66	0.54	2.07
2	4.42(+1)	0.32(-1)	9.53	17.82	8.83
3	1.58(-1)	0.88(+1)	11.63	14.12	0.00
4	4.42(+1)	0.88(+1)	12.81	20.58	2.22
5	1.0(-1.41)	0.60(0)	8.18	0.76	0.00
6	5.0(+1.41)	0.60(0)	9.44	16.26	0.81
7	3.0(0)	0.2(-1.41)	14.27	14.24	1.54
8	3.0(0)	1.0(+1.41)	11.45	19.62	0.39
9	3.0(0)	0.60(0)	17.55	18.11	0.00
10	3.0(0)	0.60(0)	14.16	17.38	0.00
11	3.0(0)	0.60(0)	11.31	19.15	2.48
12	3.0(0)	0.60(0)	14.20	18.29	0.00
13	3.0(0)	0.60(0)	15.42	19.27	0.00

* Codified values in parenthesis.

The results of these experiments were used to calculate the analysis of variance (ANOVA) shown in table 4.

Table 4 – Analysis of Variance (ANOVA) for lipase activity after 48 hours of fermentation using yeast hydrolysate as the nitrogen source

<i>Source of variation</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-test</i>	<i>F-listed</i>	<i>p-value</i>
Regression	520.94	4	130.24	67.13	3.84	<0.0001
Residual	15.53	8	1.94			
Lack of fit	13.08	4	3.27			
Pure Error	2.45	4	0.61			
Total SS	536.47	12				
$R^2 = 0.97$						

The ANOVA showed that the F_{test} for regression (67.13) was very significant as compared to F_{listed} (3.84) with $p < 0.0001$ (very significant) and an R^2 -value of 0.97, which can be considered an excellent result. R^2 -values above 0.90 are considered very good (Haaland, 1989). The low values for the pure error indicate that the model obtained had only slight lack of fit and good reproducibility. This fact can be confirmed by analyzing the results obtained at the central points (trials from 9 to 13), which showed little variation considering it was a microbiological process. According to these analyses it was possible to obtain a second-order codified model (equation 1) to represent lipase production as a function of the yeast hydrolysate and soy oil concentrations.

$$\text{Lipase activity} = 18.01 + 5.72 \text{ yeast hydrolysate} - 4.77 (\text{yeast hydrolysate})^2 + 3.00 \text{ soy oil} - 2.70 (\text{yeast hydrolysate})(\text{soy oil}) \quad (\text{eq. 1})$$

Equation 1 shows that only the quadratic term for the soy oil concentration was not significant and was thus incorporated into the lack of fit. The model represented in equation 1 was used to obtain the response surface (fig. 1).

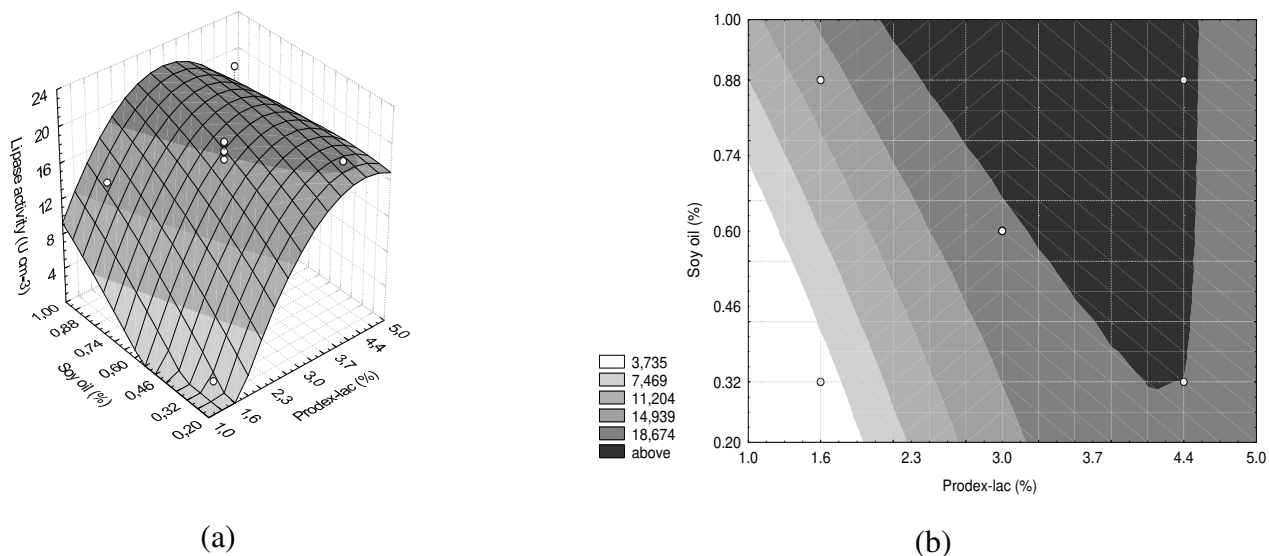


Figure 1 - (a) Response surface and (b) contour curve for lipase activity as a function of the yeast hydrolysate and soy oil concentrations.

Analyzing the surface (fig.1), the best conditions for lipase production were obtained with a yeast hydrolysate concentration from 2.8 to 4.0% and a soy oil concentration from 0.7% to 1.0%. It can be seen that there is a region of maximum lipase activity and various combinations of the yeast hydrolysate and soy oil concentrations were good to obtain maximum lipase activity. The condition selected was 3.5% of yeast hydrolysate and 0.7% of soy oil, because this combination produced a high level of lipase activity and used the minimum possible quantity of soy oil (more expensive substrate) according to the model.

Two trials were carried out using the optimized conditions to verify the results predicted by the model. Lipase activities of 23.7 and 24.7 U/mL were obtained in these trials, values about 25% above the predicted values. Comparatively, this difference between the experimental values obtained under the optimized conditions and the values predicted by the model, can be considered normal. A previous study with *Geotrichum candidum* showed that there is a variability of about 20% in lipase activity when two fermentations carried out under the same conditions are compared, the difference being caused by the inoculae, which are prepared at different moments (Burkert, 2003). The lipase activity obtained in this study was very similar to that obtained with the same microorganism in medium containing peptone as nitrogen source. The best condition of 3.6% peptone and

0.6% soy oil resulted in about 20 U/mL of lipase activity (Burkert *et al.*, 2002). Therefore, the great advantage of the present study is that similar lipase activity was obtained as compared to that obtained by the above-cited authors, but using a cheaper nitrogen source. Comparatively, the medium optimized in this work was about 95% cheaper than the medium containing peptone as nitrogen source, that resulted in similar lipase activity from the same microorganism (Burkert, 2003). Compared to the study using *Geotrichum candidum* (Baillargeon *et al.*, 1989), the values obtained for lipase activity in the present study were about four times higher.

3.2. Optimized fermentation medium containing corn steep liquor

After optimizing the medium containing yeast hydrolysate as the nitrogen source, another alternative source of nitrogen was analyzed. Corn steep liquor is a by-product from the processing of corn and contains considerable quantities of protein and different types of salts and ions. Table 5 shows the preliminary investigation carried out using corn steep liquor and other nitrogen sources, and the respective results for lipase activity.

Table 5 – Preliminary experiments using corn steep liquor and other substrates as nitrogen sources for lipase production

Trial	Fermentation medium	Lipase activity (U/mL)		
		24 hours	48 hours	72 hours
1	Corn steep liquor (10%) and soy oil (0.7%)	9.38	13.96	1.17
2	Corn steep liquor (10%), ammonium chloride (0.5%) and soy oil (0.7%)	13.30	8.25	6.88
3	Corn steep liquor (10%), yeast hydrolysate (3.5%) and soy oil (0.7%)	3.37	10.49	10.22
4	Yeast hydrolysate (3.5%) and soy oil (0.7%)	16.28	24.25	4.82
5	Peptone (3.6%) and soy oil (0.6%)	9.28	10.83	0.55

This preliminary experiment showed two important results. First, trial 4, using the best conditions obtained in the study with yeast hydrolysate as the nitrogen source, gave the highest value for lipase activity, confirming the previously obtained results. The second important result was the good lipase production obtained in trials 1, 2 and 3, using corn steep liquor as the sole nitrogen source or combined with other sources. This fact suggests that corn steep liquor could be a potential nitrogen source for this process. According to these results a 2^{4-1} fractional factorial design was applied using the concentrations of corn steep liquor, ammonium chloride, yeast hydrolysate and soy oil as the independent variables. Table 6 shows the resulting lipase activities.

Table 6 - Fractional factorial design for lipase production using corn steep liquor, ammonium chloride and yeast hydrolysate as the nitrogen sources

<i>Trial</i>	<i>Corn steep liquor (%)</i>	<i>Ammonium chloride (%)</i>	<i>Yeast hydrolysate(%)</i>	<i>Soy oil (%)</i>	<i>Lipase activity (U/mL)</i>	
					<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>
1	5.0(-1)	0(-1)	0.5(-1)	0.4(-1)	14.38	16.78
2	15.0(+1)	0(-1)	0.5(-1)	1.0(+1)	3.41	8.75
3	5.0(-1)	1.0(+1)	0.5(-1)	1.0(+1)	9.67	9.72
4	15.0(+1)	1.0(+1)	0.5(-1)	0.4(-1)	5.70	3.98
5	5.0(-1)	0(-1)	3.5(+1)	1.0(+1)	4.48	9.81
6	15.0(+1)	0(-1)	3.5(+1)	0.4(-1)	4.24	4.06
7	5.0(-1)	1.0(+1)	3.5(+1)	0.4(-1)	1.03	5.18
8	15.0(+1)	1.0(+1)	3.5(+1)	1.0(+1)	1.43	6.50
9	10.0(0)	0.5 (0)	2.0(0)	0.7(0)	1.67	4.09
10	10.0(0)	0.5 (0)	2.0(0)	0.7(0)	3.73	4.07
11	10.0(0)	0.5 (0)	2.0(0)	0.7(0)	3.79	4.18
12	10.0(0)	0.5 (0)	2.0(0)	0.7(0)	4.46	5.11

* Codified values in parenthesis.

Table 7 - Effect on lipase activity after 48 hours of fermentation

<i>Variable</i>	<i>Effect (U/mL)</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t-value (7)</i>	<i>p-value</i>
Medium	6.85*	0.92*	7.43*	<0.01*
Corn steep liquor	-4.55*	2.26*	-2.01*	0.08*
Ammonium chloride	-3.51	2.26	-1.55	0.16
Yeast hydrolysate	-3.42	2.26	-1.51	0.17
Soy oil	1.20	2.26	0.53	0.61

* Statistically significant values at $p < 0.10$.

The results shown in table 7 showed that only the corn steep liquor concentration had a significant effect at $p < 0.10$. The corn steep liquor concentration had a significant and negative effect of 4.55 U/mL, which means that the concentration at level -1 was better than the concentration at level +1. The concentration of this variable was thus reduced in the next experimental design. The ammonium chloride, yeast hydrolysate and soy oil concentrations showed no significant effects. The soy oil concentration was therefore changed to from 0.4 to 1.0%, the same range studied in the optimization of the yeast hydrolysate medium reported above. Ammonium chloride and yeast hydrolysate were removed from the fermentation medium, because their concentrations were low at level -1, 0 and 0.5% respectively. The results of this factorial design showed that corn steep liquor could be contained a quantity of salts sufficient for cell development and lipase production. This fact was reported in other previous studies (Burkert *et al.*, 2002 and Burkert *et al.*, 2004). According to the results of this factorial design, a central composite rotatable design was applied using corn steep liquor and soy oil. Table 8 shows the concentration ranges of the variables and the results obtained.

Table 8– Central composite rotatable design for lipase production using corn steep liquor as the nitrogen source

<i>Trials</i>	<i>Corn steep liquor (%)</i>	<i>Soy oil (%)</i>	<i>Lipase activity (U/mL)</i>	
			<i>24 hours</i>	<i>48 hours</i>
1	3.16(-1)	0.32(-1)	13.40	2.21
2	8.84(+1)	0.32(-1)	15.15	19.35
3	3.16(-1)	0.88(+1)	13.56	2.51
4	8.84(+1)	0.88(+1)	5.58	17.12
5	2.0(-1.41)	0.6 (0)	13.12	1.22
6	10.0(+1.41)	0.6 (0)	5.60	22.85
7	6.0 (0)	0.2(-1.41)	10.28	12.58
8	6.0 (0)	1.0(+1.41)	5.10	18.25
9	6.0 (0)	0.6 (0)	11.58	15.65
10	6.0 (0)	0.6 (0)	8.74	20.80
11	6.0 (0)	0.6 (0)	9.97	22.99
12	6.0 (0)	0.6 (0)	8.27	18.23

* Codified values in parenthesis.

The second experimental design gave the best results after 48 hours of fermentation with the maximum lipase activity at about 22.0 U/mL. The results obtained were used to calculate the analysis of variance (ANOVA) according to table 9.

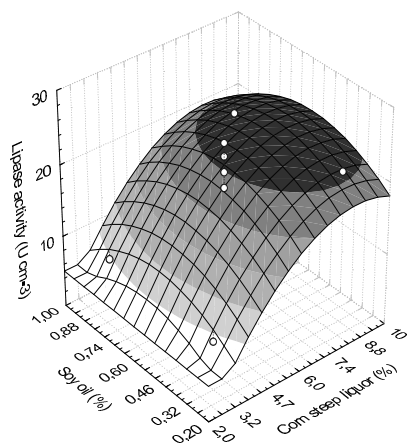
Table 9 – Analysis of Variance (ANOVA) for lipase activity after 48 hours of fermentation using corn steep liquor as the nitrogen source

<i>Source of variation</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-test</i>	<i>F-listed</i>	<i>p-value</i>
Regression	670.80	3	223.6	24.89	4.07	<0.001
Residual	71.91	8	8.98			
Lack of fit	41.64	5	8.33			
Pure Error	30.27	3	10.09			
Total SS	742.71	11				
$R^2 = 0.90$						

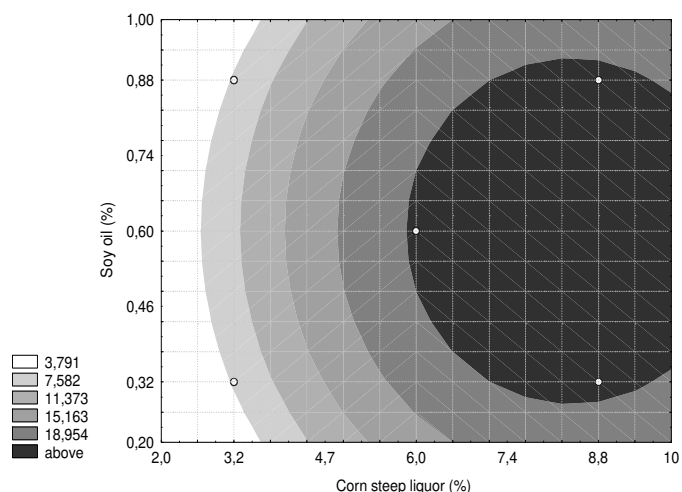
In this case the ANOVA showed that the model obtained using the experimental data from the factorial design with corn steep liquor and soy oil was significant and predictive. The F_{test} (24.89) was sufficiently higher than F_{listed} (4.07), about five times, with $p < 0.001$ and the R^2 - value was 0.90, considered to be a good value. In this case the lipase activity at the central points varied from 16 to 23 U/mL and the mean value was 19.4 U/mL, which means there was about 20% of variability in lipase activity around the mean value, which was previously observed using the same microorganism (Maldonado *et al.*, 2006). According to these analyses it was possible to obtain a second-order codified model (equation 2) that described lipase production as a function of the corn steep liquor and soy oil concentrations.

$$\text{Lipase activity} = 19.43 + 7.80 \text{ Corn steep liquor} - 4.57 (\text{Corn steep liquor})^2 - 2.87 (\text{Soy oil})^2 \text{ (eq. 2)}$$

Equation 2 shows that the linear term for soy oil and the interaction term for corn steep liquor and soy oil were not statistically significant ($p < 0.001$) and were incorporated into the lack of fit. The model represented in equation 2 was used to obtain the response surface (fig. 2).



(a)



(b)

Figure 2 - (a) Response surface and (b) contour curve for lipase activity as a function of the corn steep liquor and soy oil concentrations.

According to the surface in figure 2, the best conditions for lipase production were 8.0% of corn steep liquor and 0.6% of soy oil. Under these conditions the predicted value for lipase activity was 22.7 U/mL, which was similar to the maximum experimental values obtained in the central composite rotatable design. Comparing the lipase productions from the yeast hydrolysate and corn steep liquor mediums, there was no significant difference, and the maximum lipase activities obtained with both substrates were very similar. This is a very interesting result, because it shows that both substrates were good options for lipase production, substituting conventional nitrogen sources such as yeast extract and peptone. Corn steep liquor has another advantage, it is cheaper than yeast hydrolysate. The cost of the optimized corn steep liquor medium is equivalent to 0.5% of the cost of the medium containing peptone (Burkert, 2003) and 6.25% as compared to the yeast hydrolysate medium optimized in this study.

4. Conclusions

The compositions of optimal mediums containing alternative nitrogen sources for lipase production by *Geotrichum candidum* were obtained in this study, using factorial

designs and response surface analyses. The best conditions were 3.5% yeast hydrolysate (4.0% of total nitrogen) and 0.7% soy oil (medium 1) and 8.0% of corn steep liquor (4.6% of total nitrogen) and 0.6% soy oil (medium 2). The lipase activities obtained were about four times greater than the values found in the literature (Baillargeon *et al.*, 1989 and Hatzinikolaou *et al.*, 1996) and were similar to those found in a previous study with the same microorganism using peptone as the nitrogen source (Burkert, 2003), showing that the yeast hydrolysate and corn steep liquor can be used as substitutes for conventional nitrogen sources such as peptone (11.2% of total nitrogen) with the same efficiency for lipase production and at reduced cost, since these substrates are cheaper than conventional nitrogen sources.

5. Acknowledgements

We are grateful for the financial support from FAPESP and CNPq.

6. References

Baillargeon *et al.*, 1989 Baillargeon, M.W. Bistiline R.G. and Sonnet P.E., Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. *Appl Microbiol Biotechnol* **30** (1989), pp.92-96.

Burkert *et al.*, 2004 Burkert, J.F.M. Maugeri, F. and Rodrigues, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technol*, **91** (2004), pp. 77-84.

Burkert, 2003 Burkert, J.F.M. Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552. Campinas, 2003. 172p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

Burkert *et al.*, 2002 Burkert, J.F.M. Maldonado, R.R. Rodrigues, M.I. Estudo da Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552, XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN, Agosto, 2002.

D'Annibale et al., 2006 D'Annibale, A. Sermanni, G.G. Federici, F. and Petruccioli M., Olive-mill wastewater: a promising substrate for lipase production. *Bioresource Technol* (in press).

Djekrif-Dakhmouche et al., 2006 Djekrif-Dakhmouche, S. Gheribi-Aoulmi, Z. Meraihi, Z. and Bennamou, L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *Journal of Food Eng.*, **73**, (2006), pp.190-197.

Freire et al., 1997 Freire, D. M. Teles, E. M. F. Bom, E. P. S. and Lippel Sant' Anna Jr, G. L. Lipase and nitrogen nutrition, agitation and aeration. *Appl Biochem and Biotechnol* **63** (1997), pp.409-421.

Haaland, 1989 Haaland, P. D., Experimental design in biotechnology, New York: Marcel Dekker Inc., 1989.

Hatzinikolaou et al., 1996 Hatzinikolaou, D.G. Macris, J.B. Christakopoulos, P. Kekos, D. Kolisis, F.N. and Fountoukidis, C. Production and partial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett*, **18** (1996), pp.547-552.

Hurok et al., 2005 Hurok, O. Young-Jung, W. Jong-Sun, Y. Seung, H. H. Sangwon, J. and Hwa-Won, R. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technol*, **96** (2005), pp. 1492-1498.

Kawagutti et al., 2006 Kawagutti, H.Y. Manrich, E. and Sato, H. H. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: Culture medium optimization and cell immobilization in alginate. *Biochemical Eng Journal*, (in press).

Kona et al., 2001 Kona, R.P. Qureshi, N. and Pai, J.S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technol.*, **78** (2001), pp.123-126.

Konsoula & Liakopoulou-Kyriakides, 2006 Konsoula, Z. and Liakopoulou-Kyriakides, M. Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technol*, (in press).

Maldonado et al., 2006 Maldonado, R.R. Burkert, J.F.M. Costa, F.A.A. Maugeri, F. and Rodrigues, M.I. Elucidate and analyze the effects of inoculum size and age by optimization

lipase production by *Geotrichum candidum*, article submitted for *Enzyme Microbiol Technol.*

Mazutti et al., 2006 Mazutti, J.P.B. Treichel, H. and Di Luccio, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbiol Technol.*, **39** (2006), pp. 56-59.

Rahman et al., 2005 Rahman, R.N.Z.R.A Geok, L.P. Basri, M. and Salleh, A. An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Nutricional factors affecting protease production. *Enzyme and Microbiol Technol.*, **36** (2005), pp.749-757.

CAPÍTULO VI

LIPASE PRODUCTION BY *Geotrichum candidum* IN AIRLIFT AND STIRRED FERMENTERS USING ALTERNATIVE NITROGEN SOURCES

Rafael Resende Maldonado, Eduardo Luiz Pozza, Fátima Aparecida Almeida Costa,
Francisco Maugeri Filho and Maria Isabel Rodrigues

Corresponding author: Maria Isabel Rodrigues, Department of Food Engineering,
UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP: 13083-970, C.P.6121, Campinas, SP,
Brazil.

Fax number: (05519)3788-4027

Email: bel@fea.unicamp.br

**Artigo submetido para análise da revista *Journal Chemical Technology and
Biotechnology* em 09 de maio de 2006**

Abstract

Lipase production by *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 was analyzed in two types of bioreactor (stirred and airlift) using two complex mediums with different nitrogen sources (yeast hydrolysate or corn steep liquor). The aeration rate varying from 1.0 to 2.5 vvm was studied in an airlift reactor and the results were compared with fermentation in a stirred reactor with 300 rpm of agitation and 1.0 vvm of aeration. The best aeration in the airlift reactor was 1.0 vvm, resulting in a production of 25.0 U cm^{-3} of lipase after 56 hours of fermentation, using both mediums. The maximum lipase activities in the stirred reactor were 15.0 U cm^{-3} , after 32 hours of fermentation, and 17.0 U cm^{-3} after 36 hours, using yeast hydrolysate and corn steep liquor as nitrogen source, respectively. The best lipase productivity values were 0.479 and $0.601 \text{ U cm}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Comparatively, the airlift reactor was a good option for processes requiring a longer fermentation time. However, for shorter fermentation times, the two reactors were very similar. These results are very significant. Although they are similar to the results of other authors using conventional mediums, the costs of lipase production using the alternative nitrogen sources are about 95% lower.

Key words: Lipase; air-lift; stirring reactor; yeast hydrolysate ; corn steep liquor; productivity

INTRODUCTION

Lipases are enzymes obtained from animals, plants and microorganisms (bacteria, yeast and fungi). Their principal function is to catalyze the hydrolysis of triglycerides to produce fatty acids, diacylglycerides, monoglycerides and glycerol. This reaction is reversible and so the enzymes can then catalyze the formation of triglycerides from the acylglycerols and fatty acids at the oil-water interface¹.

The various applications of lipases include specific organic syntheses, fat and oil hydrolysis and modification, flavor enhancement in food processing, the resolution of racemic mixtures and chemical analyses². Recently, immobilized lipase produced by *Rhizopus oryzae* was used in biodiesel-fuel production by the methanolysis of plant oils such as soybean oil, in an airlift bioreactor³.

Lipase productivity is affected by different environmental factors such as agitation, aeration, temperature, pH, medium composition and the presence of inducers, amongst others⁴. Filamentous fungi are frequently used in fermentation processes because their extracellular enzymes make recovery easier than in processes using other types of microorganism. However, mechanical agitation generally damages the cellular mycelium and reduces enzyme production. Improvements were observed using a fermenter with no mechanical agitation as compared to the use of a conventional fermenter, probably due to better preservation of the mycelium during the fermentation time⁵. To make a satisfactory choice between different bioreactor types, their performances must be assessed and compared to the more conventional stirred fermenter.

Lipase production was studied in stirred and airlift reactors using peptone as the nitrogen source, and the results showed that the lipase activity produced in both reactors was very similar, although productivity in the airlift reactor was 60% higher than in the stirred reactor⁶. Cellulase production by *Aspergillus fumigatus* was studied in disc turbine agitator vessels and in an airlift fermenter. The enzyme activity decreased with increasing agitation rate in the disc turbine agitator vessels, and under similar conditions, was 20% higher using the airlift fermenter. The airlift fermenter avoids the shear effects produced by the disc turbine agitator in conventional fermenters and this fact improved the enzyme activity⁷.

Production costs are a very important parameter, which must be carefully analyzed for bioprocesses. The highest level of enzyme activity was obtained using conventional components such as peptone or yeast extract, but these substrates are very expensive. Alternative nitrogen sources have been used to minimize the production costs of many enzymes. Lipase production by *Geotrichum sp.* was studied using corn steep liquor as the nitrogen source, and 19.0 U cm⁻³ lipase activity was obtained after 9.0 hours of fermentation in a stirred reactor⁸. The best conditions for lipase production by *Rhizopus sp.* BTNT-2 were obtained using potato starch (1.25%w/v), corn steep liquor (1.5%w/v) and olive oil (0.5%v/v), as the carbon, nitrogen and lipid sources, respectively. The maximum lipase activity of 59.2 U.cm⁻³ was obtained after 48 hours of fermentation at 120 rpm, 28°C and an initial pH of 5.5, a value 206% higher than the initial lipase activity obtained before optimization of the medium⁹. Lipase activity of 24.0 U. cm⁻³ was produced in shaker flasks

by *G. candidum* NRRL Y -552 using 3.5% of yeast hydrolysate as the nitrogen source and 0.7% of soy oil as the production inducer¹⁰.

The aim of this study was to optimize the aeration conditions in an airlift bioreactor for lipase production by *G.candidum* NRRLY-552 using alternative nitrogen sources, and compare these results with those obtained in a bench scale stirred bioreactor.

MATERIAL AND METHODS

Fermentation

G.candidum NRRL Y-552 from the Agricultural Research Service Collection, Peoria, III was chosen for the lipase production. The inoculum was prepared from a solution containing spores obtained from malt extract agar using 1.0 mL of distilled water. This solution was incubated at 30°C for 48 hours in a Petri plate containing Yeast Malt Agar. A circular area of 0.79 cm² was then cut out and placed in a flask containing the inoculum medium, consisting of 5.0% peptone (Difco), 0.1% of NaNO₃ (Synth), 0.1% of MgSO₄ (Ecibra) and 1.0% of soy oil (Soya). This medium was incubated for 15 hours at 30°C and 250 rpm and then transferred to the fermentation medium¹¹.

The fermentations were carried out in an airlift fermenter with aeration of from 1.0 to 2.5 vvm, temperature of 30°C and initial pH of 7.0. Two complex media were used, one containing 3.5% of yeast hydrolysate (hydrolyzed protein from Prodesa) and 0.7% of soy oil and the other containing 8.0% of corn steep liquor (Corn Products) and 0.6% of soy oil. Fermentations were also carried out in a stirred reactor to compare the results with those of the airlift fermenter. In this case, the same complex media were used, and the fermentations were carried out at 300 rpm, 1.0 vvm, 30°C and an initial pH of 7.0⁶. All fermentations were performed with a 2.2L volume of medium and 10% (v/v) of inoculum. Lipase activity, pH during the fermentation time and dissolved oxygen, were analyzed as the process responses.

Analytical methods

Lipase activity was measured by titration with 0.05M NaOH using emulsified olive oil as the substrate. The reaction mixture consisted of 19 mL of an olive oil/ gum Arabic

emulsion (5% olive oil and 5% gum Arabic) in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. This mixture was homogenized in a blender for 3 min and the enzyme reaction started by adding 1 mL of culture supernatant. The assay was carried out at 37°C and 200 rpm for 30 min. The reaction was stopped by adding 20 mL of acetone-ethanol 1:1 (v/v), and the amount of fatty acids produced determined by titration with 0.05M NaOH to pH 11.0, using an automatic titration apparatus (Mettler DL21). One unit of lipase activity was defined as the amount of enzyme that liberates 1 μmol of fatty acid equivalents per minute under the assay conditions¹².

Dissolved oxygen and pH were measured using electrodes connected to the fermenter.

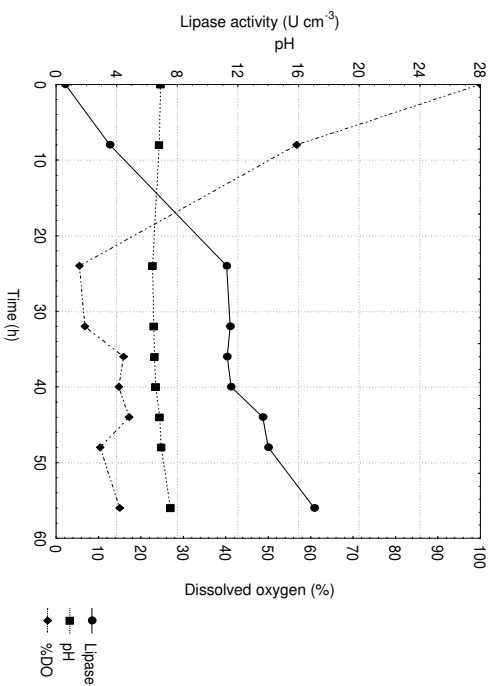
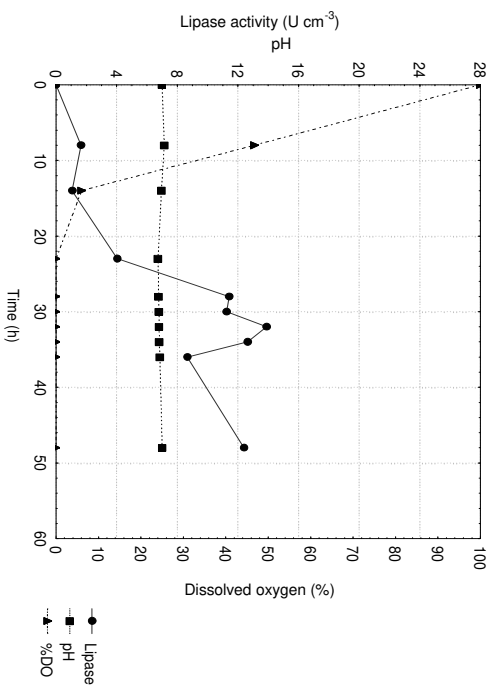
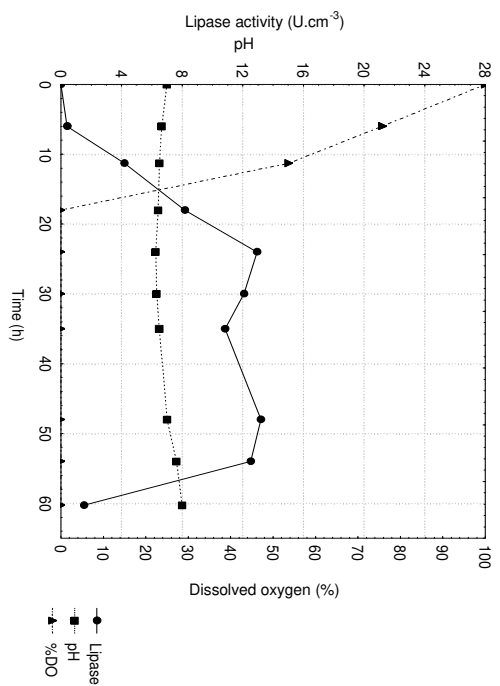
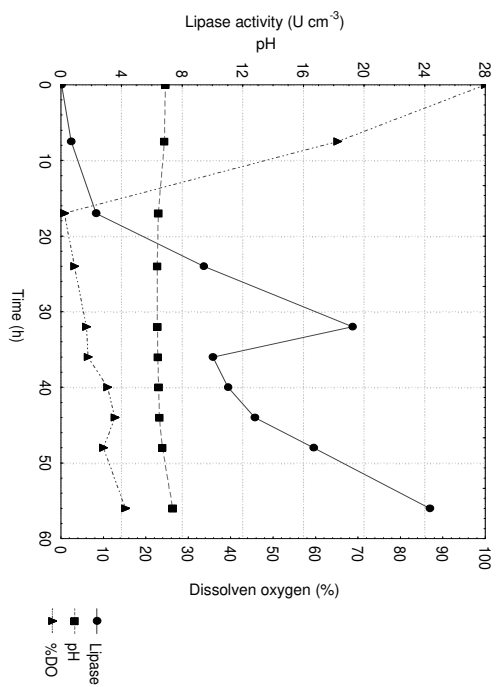
Results and Discussion

Lipase production in an airlift reactor

The maximum lipase activity of 24.0 U cm^{-3} was obtained after 56 hours of fermentation with 1.0 vvm of aeration using yeast hydrolysate or corn steep liquor as the nitrogen source. The maximum lipase productivities of 0.601 and $0.535 (\text{U cm}^{-3} \text{ h}^{-1})$ were also obtained with 1.0 vvm of aeration after 32 and 36 hours of fermentation, using yeast hydrolysate and corn steep liquor respectively as the nitrogen source. Table 1 shows the results for maximum lipase activity and productivity in the two media. The pH and dissolved oxygen profiles during the fermentation time under the different aeration conditions are shown in Figure 1.

Table 1 – Maximum lipase activity and maximum lipase productivity for lipase production in an airlift reactor using yeast hydrolysate and corn steep liquor as the nitrogen sources

<i>Aeration (vvm)</i>	<i>Yeast hydrolysate</i>		<i>Corn steep liquor</i>	
	<i>Maximum lipase activity ($U\ cm^{-3}$)</i>	<i>Maximum lipase productivity ($U\ cm^{-3}\ h^{-1}$)</i>	<i>Maximum lipase activity ($U\ cm^{-3}$)</i>	<i>Maximum lipase productivity ($U\ cm^{-3}\ h^{-1}$)</i>
1.0	24.3	0.601	24.8	0.535
1.5	12.1	0.539	11.7	0.315
2.0	13.9	0.434	12.3	0.372
2.5	17.1	0.469	18.1	0.463



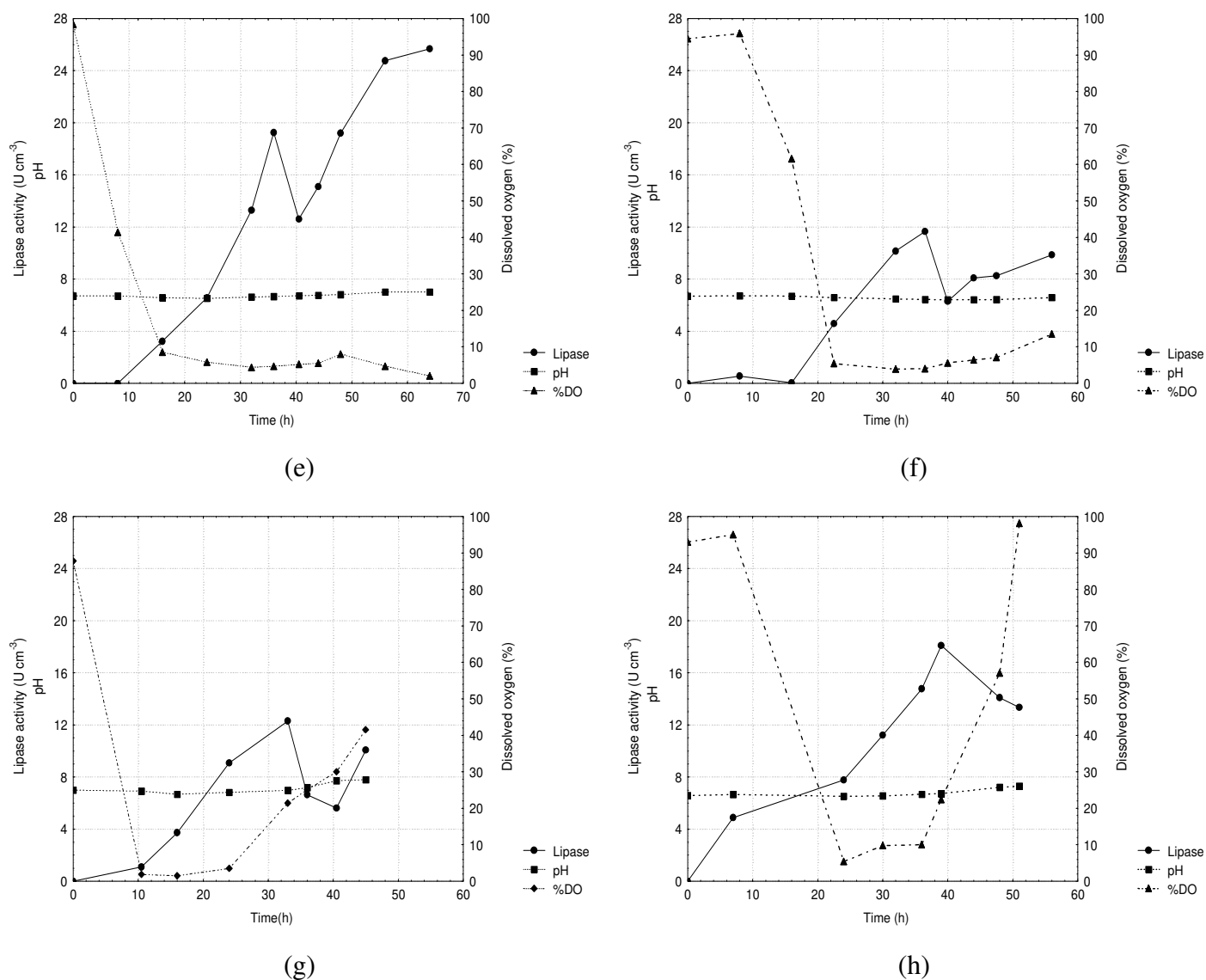


Figure 1 – Lipase activity, pH and dissolved oxygen during the fermentation time using yeast hydrolysate with (a) 1.0 (b) 1.5 (c) 2.0 and (d) 2.5 vvm and using corn steep liquor with (e) 1.0 (f) 1.5 (g) 2.0 and (h) 2.5 vvm of aeration

The maximum lipase activity, about 24.0 U cm⁻³, was obtained using 1.0 vvm of aeration in both media, while under other conditions, the lipase activities were below 18.0 U cm⁻³. However, the time needed to obtain the maximum lipase activity using 1.0 vvm was much higher than that required under higher aeration conditions. This was probably due to the cell growth being slower at the low aeration rate, but this aeration condition

preserved the cell mycelium for a longer time, resulting in higher lipase activity as observed in other studies using filamentous fungi⁵⁻⁷.

The maximum lipase productivities of 0.601 and 0.535 U cm⁻³ h⁻¹ were also obtained with 1.0 vvm of aeration, but with 32 and 36 hours of fermentation, using yeast hydrolysate and corn steep liquor respectively as the nitrogen source. The maximum lipase activity and maximum productivity were obtained at different times, the maximum lipase productivities occurring between 24 and 40 hours, while the maximum lipase activities occurred between 32 and 56 hours (fig 1). Using yeast hydrolysate as the nitrogen source, the results showed that an increment of 75% in the fermentation time (from 32 to 56 hours) resulted in an increment of 26% in the lipase activity, but the productivity decreased about 28%. The same relation was observed when corn steep liquor was used as the nitrogen source: an increase of 55% in the fermentation time (from 36 to 56 hours) resulted in an increment of 29% in the lipase activity and a 17% decrease in productivity. In this case, the increase in lipase activity was not sufficient to justify the increment in process time, since it reduced productivity. Energy consumption and process times are generally more important when considering the overall process, since they greatly affect the costs of the process.

Another important variable was the pH, which was a good indicator of the end of fermentation. As can be seen in figure 1, the pH values decreased during the first hours of fermentation to values between 6.5 and 7.0, and these values generally went up again after 50 hours of fermentation. pH values of about 7.0 contribute to obtaining and maintaining high lipase activity, because this enzyme is more stable at pH values of around 7.0 and its half-life decreased considerable at pH values above 8.0^{13,14}. These results represent another important reason for choosing low process times, because the pH values increased considerably when the fermentation time increased.

Under better aeration conditions, the dissolved oxygen fell very fast in the first hours of fermentation, but after 15 hours the oxygen concentration increased continuously up to the end of fermentation, showing that the oxygen supply was sufficient for the cell metabolism, even when using a low aeration condition. Under other aeration conditions, the dissolved oxygen also fell during the first 15 or 20 hours of fermentation, but did not go up again after this time. This was probably due to a high biomass concentration in the reactor, required a greater oxygen concentration. Although the high biomass concentration

decreased the recycle in ferment and probably had a negative effect on lipase activity. This phenomenon also occurred with *G. candidum* when airlift fermentation was carried out using conventional medium⁶. The poor medium hydrodynamics within the reactor increased with the increase in fermentation time, which also showed that low fermentation times are a better option for this process.

Aeration of 1.0 vvm and a process time of up to 40 hours are the best conditions for lipase production in an airlift reactor, since these conditions allow for the maximum lipase productivity, prevent hydrodynamic recycling problems in the reactor and maintain the enzyme more stable with pH values of around 7.0. The prior optimization of the fermentation medium was very important, giving very similar results, independent of the nitrogen source. This fact showed that the conclusion of this work had a strong relationship with process variables such as aeration, pH value and dissolved oxygen and can be used as a parameter for other processes with filamentous fungi.

Lipase production in a stirred reactor

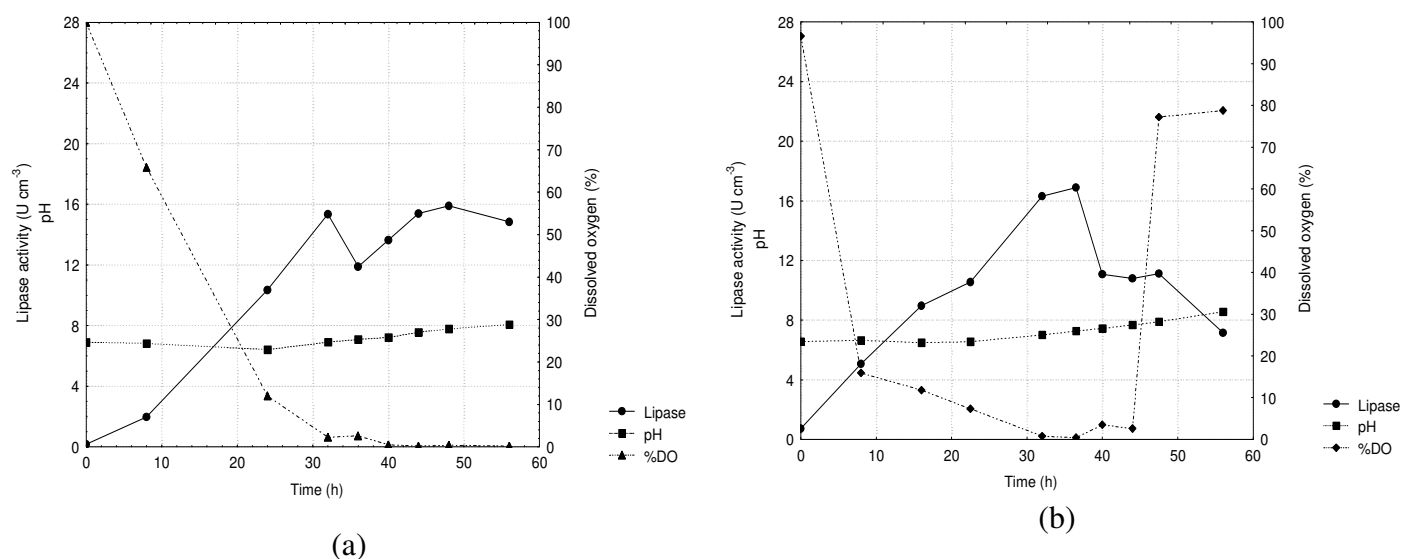


Figure 2 – Lipase activity, pH and dissolved oxygen during the fermentation time using (a) yeast hydrolysate and (b) corn steep liquor as the nitrogen source in a stirred reactor at 300 rpm and 1.0 vvm.

Lipase production by *G.candidum* was also performed in a stirred reactor and the maximum lipase activities were between 15.0 and 17.0 U cm⁻³ after 32 hours of fermentation, using yeast hydrolysate or corn steep liquor as the nitrogen source, respectively, as shown in figure 2. Comparing the airlift and stirred reactors, the maximum lipase activities in the stirred reactor were between 56 and 40% smaller. Differently to that observed in the airlift reactor, an increase in fermentation time in the stirred reactor did not result in an increment in lipase activity. The higher shear rate due to the mechanical agitation probably contributed to the low lipase activity obtained in this case. This effect was observed in previous work with the same microorganism using peptone as the nitrogen source in a stirred reactor⁶.

The best lipase productivities, in this case, were 0.479 and 0.509 U cm⁻³ h⁻¹ using yeast hydrolysate and corn steep liquor, respectively. Both results for productivity were obtained after 32 hours of fermentation, at the same time in which the highest lipase activities were obtained. Productivities in the stirred reactor were smaller compared to the values obtained in the airlift reactor, as previously reported⁶. However, the difference in productivities between the airlift and stirred reactors was not much different in this case; productivity using the yeast hydrolysate was 25% higher in the airlift reactor as compared to the stirred reactor, while that using corn steep liquor was only 6% higher in the airlift reactor. According to these results, the best productivities were very similar in both reactors, when compared using the same nitrogen source. Thus, the two reactors have a similar performance up to 40 hours of processing, but after this time, the airlift reactor showed a considerable advantage with respect to lipase activity. If productivity is considered to be the most important parameter, then it can be concluded that the airlift and stirred reactor processes were equivalent. However, the airlift reactor can be a good option in fermentations with filamentous fungi that require a longer fermentation time, since the damage to the mycelium is considerable lower without mechanical agitation, as already observed in other studies^{5,6,7,15}.

The maximum lipase activity was about 30% higher when using peptone as the nitrogen source, as compared to yeast hydrolysate and corn steep liquor. However, the productivities using the alternative nitrogen sources were about 20% higher as compared to the conventional medium⁶. For this process, alternative nitrogen sources have the advantage

of higher productivity, which is an interesting response in this case. In addition, yeast hydrolysate and corn steep liquor were cheaper as compared to peptone, the cost of the medium in this case being about 95% lower¹⁰.

Relationship between K_{La} and lipase production and productivity

The oxygen supply, which can be represented by the K_{La} values, is an important factor affecting lipase production by *G. candidum*⁶. The relationship between K_{La} and lipase productivity in the airlift reactor is shown in figure 3.

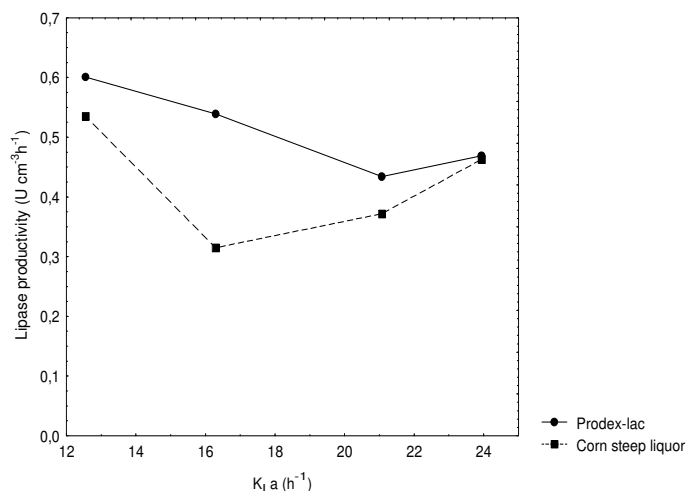


Figure 3 – Relationship between K_{La} and lipase productivity in the airlift reactor.

As observed before⁶, augmentation of the K_{La} values decreased lipase productivity under higher aeration conditions, due to a fast cell growth rate leading to a high biomass concentration, which blocked the biomass recycle process in the reactor. In fact, the poor medium hydrodynamics reduced the maximum lipase productivity.

CONCLUSIONS

The results obtained in this work showed that the use of alternative nitrogen sources was a good option to reduce the costs of lipase production, as observed in other studies¹⁶⁻¹⁸. Another important conclusion is that the airlift reactor is a good option for the traditional stirred reactors usually used in the production of bioproducts such as enzymes, when the process requires long fermentation times. The lipase activity obtained in the airlift reactor was higher than that obtained in the stirred reactor using the alternative nitrogen sources

(yeast hydrolysate or corn steep liquor). The maximum lipase activity and the maximum lipase productivity were also higher when comparing alternative nitrogen sources with peptone. The lipase activity obtained in this work was four to five times higher than the values previously found for the same microorganism¹⁹ and up to 55% higher than those obtained in the same process using peptone as the nitrogen source⁶.

REFERENCES

1. Hatzinikolaou D G, Macris J B, Christakopoulos P, Kekos D, Kolisis F N and Fountoukidis C, Production and partial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Lett* **18** (5):547-552 (1996)
2. Sharma R, Chisti Y and Banerjee U C, *Biotechnol. Advanc* **19**:627-662 (2001).
3. Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E and Fukuda H, Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochem Eng Journal*. **23** (1):45-51 (2005).
4. Corzo G and Revah S, Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Biores Technol* **70**: 173-180 (1999).
5. Wase D J, Raymahasay S, Wang C W, Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enz Microbiol Technol* **7**(5): 225-229 (1985).
6. Burket J F M, Maldonado R R, Maugeri F and Rodrigues M I, Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters, *Journal of Chem Techn and Biotechn* **80**:61-67 (2005).
7. Wase D A J, McManamey W J, Ravmahasav S and Vaid A K, Comparisons between cellulase production by *Aspergillus fumigatus* in agitated vessels and in an air-lift fermentor. *Biotechn and Bioeng* **27**(8): 1166-1172 (1985).
8. Kamimura E S, Medieta O, Rodrigues M I and Maugeri F. Studies of lipase-affinity adsorption using response-surface analysis. *Biotechn Appl Biochem* **33**:153-159 (2001).
9. Bapiraju K V V S N, Sujatha P, Ellaiah, P and Ramana T, Sequential parametric optimization of lipase production by a mutant strain *Rhizopus* sp. BTNT-2, *Journal of Basic Microb* **45**(4):257-273 (2005).

10. Maldonado R R, Burkert J F M, Maugeri F and Rodrigues M I Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais, in VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa, Dec, p 121 (2002).
11. Burkert J F.M, Maldonado R R, Rodrigues M I Estudo da Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, p 110 (2002).
12. Freire D M, Teles E M F, Bon E P S, Lippel Sant'anna Jr G L, Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation and aeration. *Appl Biochem and Biotechnol* **63**:409-421 (1997).
13. Burkert J F M, Maldonado R R, Maugeri F and Rodrigues M I, Caracterização Bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552, in Caderno de Resumo do IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, p 162 (2001).
14. Pozza E L, Maldonado R R, Maugeri F and Rodrigues M I, Caracterização parcial da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 produzida com meios industriais, VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro (2005).
15. Shinonaga M A, Kawamura Y, Shimbo K and Yamane T, Continuous production of phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 immobilized with cross linked chitosan beads. *Journal of Ferm and Bioeng* **81(4)**:310-314 (1996).
16. Treichel H, Estudo da produção e purificação da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 utilizando meios industriais. Tese de Doutorado FEA UNICAMP, Campinas (2004).
17. Upadhyay C M, Nehet P N and Khotari R M, Alternative economical starchy substrates for the production of 70 percent sorbitol. *Biotechnon Lett*, **11**:793-796 (1989).
18. Mendieta O W, Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica. Tese de Doutorado, FEA, UNICAMP, Campinas (1999).
19. Baillargeon M W, Bistline R G and Sonnet P E, Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production ad fatty acidy specific. *Appl Microbiol and Biotechnol* **30**:92-96 (1989).

CAPÍTULO VII

ESTUDO DA ETAPA DE *Up Stream* E PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* PRODUZIDA COM MEIOS INDUSTRIAIS

Eduardo Luiz Pozza, Rafael Resende Maldonado, Francisco Maugeri e Maria Isabel Rodrigues

¹Universidade Estadual de Campinas- Faculdade de Engenharia de Alimentos

Caixa Postal 6121 Campinas – SP – elpozza@fea.unicamp.br

Artigo apresentado no **XV Simpósio Nacional de Fermentações** (Sinaferm) realizado em agosto de 2005 em Recife/PE, publicado nos Anais do evento na forma de CD.

RESUMO

As lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de lipídios, transformando-os em produtos, como ácidos graxos livres, glicerol, mono e dissacarídeos. Estudos da produção destas enzimas, via fermentação, vêm sendo realizados desde as últimas décadas, devido ao seu grande apelo industrial. Possuem grande importância na indústria de alimentos (como modificadores de aroma e em laticínios), farmacêutica (digerindo óleos e gorduras em alimentos), química fina (na fabricação de detergentes) e na área medicinal (pela determinação de tri acil gliceróis no sangue).

Utilizou-se neste trabalho, dois meios de fermentação distintos utilizando resíduos industriais como fonte de nitrogênio para o microrganismo, um com água de maceração de milho, submetida a um processo de clarificação utilizando carvão ativado, e o outro meio (com concentrações previamente otimizadas) continha Prodex-lac[®] (hidrolisado de leveduras) sem sofrer o processo de clarificação. Na clarificação do meio foram estudadas concentrações de água de maceração de milho de 8 a 15%. Os melhores resultados de atividade lipolítica foram obtidos com as concentrações de 9 e 12%. A partir de cromatografia de interação hidrofóbica foi possível separar parcialmente as lipases produzidas com os meios industriais de Prodex-lac[®] e água de maceração de milho, obtendo-se uma recuperação enzimática e fator de purificação de 94,3% e 86,7 vezes, respectivamente, para o meio contendo Prodex-lac[®] e 96% e 44,3 vezes para o meio clarificado.

INTRODUÇÃO

As lipases compreendem um grupo de enzimas (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) encontradas em vegetais, animais e microrganismos. Sua característica é catalisar a reação de hidrólise de triacilglicerol, obtendo ácidos graxos livres, di e monoacilglicerol e glicerol. Essa reação é reversível e, portanto essas enzimas catalisam a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água (Hatzinikolaou *et all* 1996).

O aumento nas últimas décadas, no interesse da produção de lipases microbianas deve-se ao seu amplo potencial de aplicações industriais em aditivos de alimentos com a função de modificação de aroma, síntese de ésteres, produção de detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de efluentes decompondo e removendo substâncias oleosas, em cosméticos

removendo lipídeos, na área farmacêutica agindo na hidrólise de óleos e gorduras em alimentos, na remoção de lipídeos em peles de animais para a fabricação de couros e na medicina pela determinação de triglicerídeos no sangue (Castro & Anderson, 1995).

A produção de lipase é amplamente discutida na literatura devido ao grande potencial de aplicação desta enzima. A obtenção da mesma através de meios complexos utilizando resíduos industriais tem um apelo econômico quanto à viabilização da produção industrial e também ecológico. Tem-se verificado que é possível obter os mesmos níveis de atividade enzimática utilizando estes resíduos industriais como substrato para o microrganismo quanto os meios sintéticos. No entanto, a tendência atual do mercado pela produção de enzimas por via biotecnológica é ver esses processos de forma integrada, para que a otimização seja realizada desde as etapas iniciais do preparo do meio e condições de cultivo (“up stream”) até a fase de purificação (“down stream”).

O uso da água de maceração de milho (água de maceração de milho) para a produção desta enzima tem sido estudado e os resultados após a otimização são semelhantes aos obtidos com meio sintético. No entanto, o uso da água de maceração de milho pode tornar inviável a etapa de recuperação e purificação da enzima, necessitando assim uma etapa prévia de clarificação do meio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para se obter as melhores condições para produção de lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 foram realizados experimentos utilizando um meio clarificado com água de maceração de milho como fonte de nitrogênio. Para efeito de comparação foram realizados testes com a enzima obtida com um meio industrial não clarificado (3,5% de Prodex-lac® e 0,7% de óleo de soja, segundo Maldonado *et al* (2002)).

O meio contendo água de maceração de milho é previamente tratado com 8% de carvão ativo, a 65°C e 150 rpm por 1 hora. Após o tratamento, o meio é filtrado 2 vezes, segundo Treichel *et al* (2004).

A concentração de água de maceração de milho foi estudada na faixa de 8 a 15% e utilizou-se 0,6% de óleo de soja, adicionado ao meio após o tratamento com carvão ativo e filtração. O pH final do meio foi ajustado para 7 e as fermentações foram realizadas em

frascos agitados a 250 rpm e 30°C durante 48 horas, de acordo com Maldonado *et al* (2003). O meio fermentado foi filtrado a vácuo e as amostras foram congeladas para análise de atividade lipolítica.

Para a purificação das enzimas utilizou-se cromatografia em coluna de interação hidrofóbica de butyl Sepharose como a fase estacionária num sistema FPLC com vazão de 0,5 mL/min. Equilibrou-se a coluna com tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 adicionado de NaCl (fase móvel) previamente filtrado em membrana Millipore de 0,45 µm de diâmetro de poros. Fez-se eluição com o mesmo tampão, porém sem o NaCl. Nos testes preliminares optou-se por usar 1 cm de altura de resina numa coluna de 1 cm de diâmetro. As concentrações de NaCl testadas na fase móvel foram: 2, 3 e 4 mol/L. Coletou-se amostras em frações de 8 mL, realizou-se análises de proteína de acordo com o método descrito por Lowry *et al*, (1951) e de atividade lipolítica para se obter o fator de purificação e a porcentagem de recuperação da enzima.

Para a purificação, visando a posterior caracterização da enzima, modificou-se a altura de resina para 10 cm com o objetivo de se obter uma maior quantidade da enzima purificada. As frações coletadas foram de 20 mL e utilizou-se a fração que apresentou uma maior atividade lipolítica para estudo de caracterização utilizada em outro trabalho.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira etapa a água de maceração de milho foi estudada nas condições de 8, 9 e 10% em triplicatas (A,B e C). A atividade enzimática foi determinada em cada ensaio após 24 e 48 horas de fermentação. O acompanhamento da atividade enzimática e do pH, em função do tempo pode ser visualizado na figura 1. De acordo com a figura 1(a), a máxima atividade lipolítica de 18,17 U/mL foi obtida após 48 horas de fermentação, com meio utilizando 9,0% de água de maceração de milho, estes resultados são similares aos obtidos por Maldonado *et al* (2002), utilizando 8% de água de maceração de milho em um meio não clarificado, obtendo cerca de 17,0 U/mL. Através da figura 1(b), observa-se que há uma diminuição inicial do pH e após 24 horas de processo há um aumento do valor do mesmo. Esses resultados apresentam o mesmo comportamento de ensaios realizados com o mesmo microrganismo feitos por Burket *et al* (2001) e Maldonado *et al* (2002), com meios sintético e industrial, respectivamente.

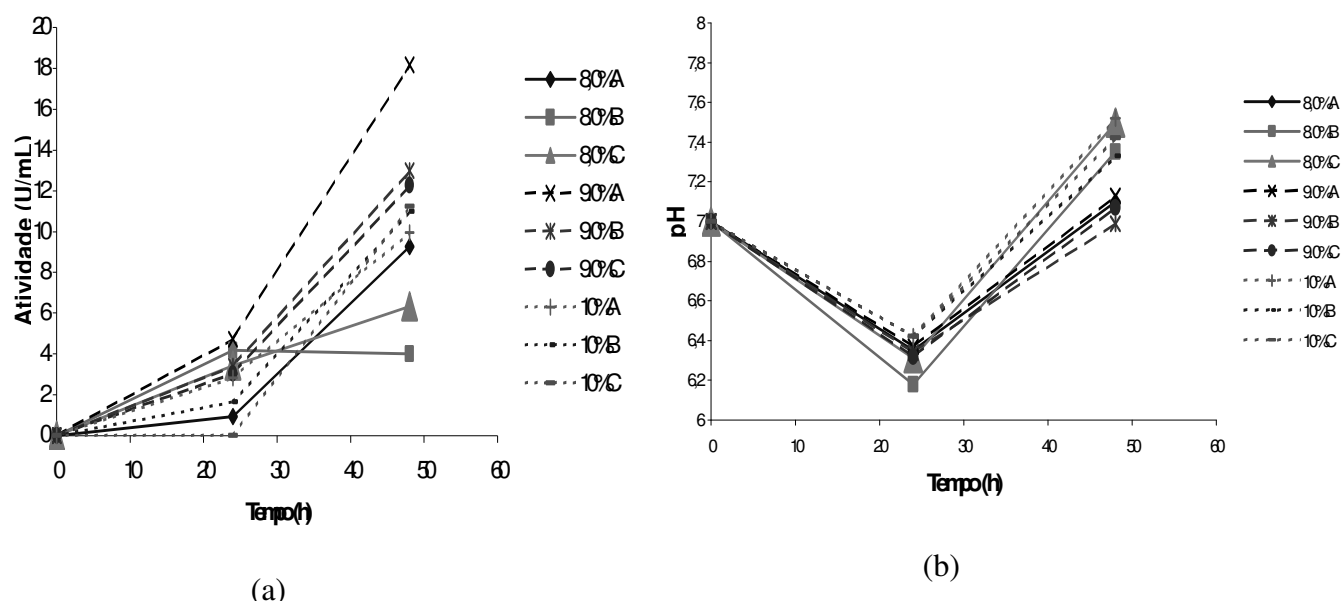


Figura 1: Acompanhamento (a) da atividade lipolítica e (b) do pH em função do tempo na produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 com meio industrial clarificado.

Para determinar se há diferença significativa entre as concentrações utilizadas neste experimento foi feita a análise de variância (ANOVA) e um teste de Tukey para a atividade no tempo de 48 horas de fermentação. Foi calculada a mínima diferença significativa (MDS), a qual foi de 4,96 U/mL. O teste de Tukey está apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Teste de Tukey para a validação do estudo das concentrações de água de maceração de milho estudadas.

Ensaio	48h (U/mL)	Média* (U/mL)	Desvio Padrão
8,0% A	9,28	6,54 ^a	2,65
8,0% B	4,00		
8,0% C	6,33		
9,0% A	18,17	14,47 ^b	3,22
9,0% B	12,97		
9,0% C	12,27		
10,0% A	9,94	10,72 ^{a,b}	0,68
10,0% B	11,00		
10,0% C	11,22		

* Médias marcadas com letras diferentes, diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Comparando-se as médias obtidas em cada condição conclui-se que houve diferença significativa apenas entre os ensaios realizados com as concentrações de 8 e 9%, com uma diferença de 7,93 U/mL.

A partir dos resultados obtidos no primeiro experimento utilizando meio clarificado, decidiu-se realizar um segundo experimento estudando a concentração de água de maceração de milho numa faixa mais ampla, nas concentrações de 9, 12 e 15%. Neste experimento foram coletadas amostras nos tempos de 24, 35 e 48 horas de fermentação para análise do pH e da atividade lipolítica. O acompanhamento da atividade enzimática e do pH, em função do tempo podem ser visualizados na figura 2.

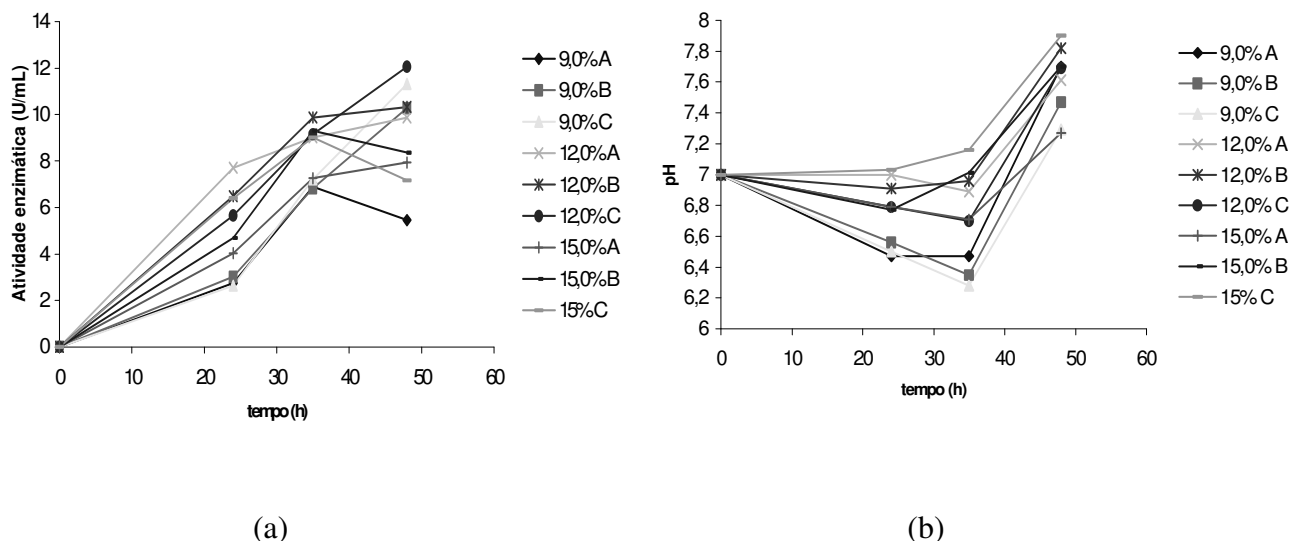


Figura 2: Acompanhamento (a) da atividade lipolítica e (b) do pH em função do tempo na produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 utilizando meio industrial clarificado.

Observando a figura 2(a) nota-se que a atividade enzimática nas três concentrações utilizadas foram semelhantes após 48 horas de fermentação, havendo uma queda entre 35 e 48 horas para a concentração de 15%. A figura 2(b) mostra que o pH do meio teve um perfil semelhante ao obtido no ensaio anterior e também por Burket *et al* (2001) e Maldonado *et al* (2002), com o mesmo microrganismo, ocorrendo um decréscimo inicial no pH até 24 horas, com posterior aumento deste até o final da fermentação. Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey para

verificar se houve diferença entre as concentrações utilizadas. A mínima diferença significativa (MDS) para estes ensaios foi de 4,11 U/mL. O teste de Tukey está apresentado na tabela 2.

Tabela 2: Teste de Tukey para a validação do estudo das concentrações de água de maceração de milho estudadas.

<i>Ensaio</i>	<i>48h (U/mL)</i>	<i>Média* (U/mL)</i>	<i>Desvio Padrão</i>
9,0% A	5,46	9,01 ^a	3,12
9,0% B	10,27		
9,0% C	11,31		
12,0% A	9,87	10,75 ^a	1,15
12,0% B	10,32		
12,0% C	12,05		
15,0% A	7,94	7,83 ^a	0,60
15,0% B	8,37		
15,0% C	7,18		

*Médias marcadas com letras diferentes, diferem significativamente entre si (p>0,05) pelo teste de Tukey.

Analisando a tabela 2 nota-se que nas médias obtidas em cada condição não houve diferença estatisticamente significativa entre as três concentrações utilizadas neste experimento a 95% de confiança, sendo as diferenças entre essas médias, menores que a MDS calculada. Isso indica que não há diferença significativa na atividade enzimática ao utilizar qualquer uma das três concentrações.

Para a realização da etapa seguinte de purificação da enzima obtida com o meio clarificado optou-se por utilizar 12% de água de maceração de milho para obtenção da enzima, para se ter uma margem de segurança de concentração para estes estudos e para uma possível ampliação do processo em escala industrial.

Após a finalização dos estudos da concentração do meio clarificado, realizou-se o estudo da purificação das enzimas obtidas com os dois diferentes meios de fermentação.

Para a determinação das melhores condições de purificação foram realizados testes preliminares, variando-se a concentração de NaCl na fase móvel, de acordo com a metodologia descrita por Mendieta (1999). As concentrações de NaCl testadas na fase móvel foram: 2, 3 e 4 mol/L e foram coletadas amostras em frações de 8 mL. O tamanho

utilizado da coluna contendo a resina butyl Sepharose foi de 1 cm de altura e de diâmetro interno. O cálculo da quantidade de proteína total em cada amostra coletada foi realizado de acordo com a metodologia de Lowry *et al*, (1951), utilizando uma curva linearizada padrão. A atividade específica (A_{esp}) e o fator de purificação (FP) foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente.

$$A_{esp} = \frac{\bar{A}}{proteína} \quad (Eq. 1)$$

$$FP = \frac{A_{esp}(purificada)}{A_{esp}(bruta)} \quad (Eq. 2)$$

onde: $\bar{A}$ = atividade lipolítica média; A_{esp} (purificada) = atividade específica (U/mg) da amostra purificada; A_{esp} (bruta) = atividade específica (U/mg) da amostra no estado bruto.

Os resultados obtidos de atividade enzimática recuperada utilizando as diferentes concentrações salinas estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da purificação da lipase obtida com (a) meio clarificado contendo água de maceração de milho e (b) obtida com meio não clarificado contendo Prodex-lac[®], em diferentes concentrações salinas na fase móvel.

<i>Concentração salina na fase móvel</i>	<i>Atividade recuperada (U/mL)</i>	<i>Concentração salina na fase móvel</i>	<i>Atividade recuperada (U/mL)</i>
2 g/L	5,38	2 g/L	5,11
3 g/L	4,98	3 g/L	4,69
4 g/L	5,5	4 g/L	6,48
Bruta	11,06	Bruta	11,97
(a)		(b)	

Para a obtenção da enzima purificada para realização do estudo de caracterização decidiu-se utilizar uma concentração de 3 mol/L de NaCl na fase móvel, pois apesar de apresentar um menor fator de purificação, esta condição foi a que evitou perdas na etapa inicial de eluição e na qual se obteve a recuperação da enzima em apenas uma fração coletada, fato este interessante para a realização do estudo de temperatura e pH ótimo (explorados em outro trabalho paralelo a este), onde é necessário uma maior atividade enzimática numa única amostra.

Na etapa seguinte, a altura de resina utilizada na coluna foi de 10 cm e a quantidade de meio bruto injetado foi de 20 mL, sendo coletadas frações de 23 mL. Nestas condições obteve-se lipase purificada com uma atividade enzimática de 9,9 U/mL para o meio de água de maceração de milho e 9,43 U/mL para o meio contendo Prodex-lac[®], obtidas na segunda fração após o início da eluição. A recuperação de atividade lipolítica foi de 96% e o fator de purificação foi de 44,3 vezes para a enzima obtida com o meio clarificado e a recuperação enzimática para a lipase obtida com o meio contendo Prodex-lac[®] foi de 94,3% e o fator de purificação de 86,7 vezes. As enzimas obtidas foram diluídas em tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0 até uma atividade enzimática de aproximadamente 7,0 U/mL. As figuras 3 e 4 apresentam os cromatogramas dos ensaios utilizado as lipases obtidas com os dois diferentes meios.

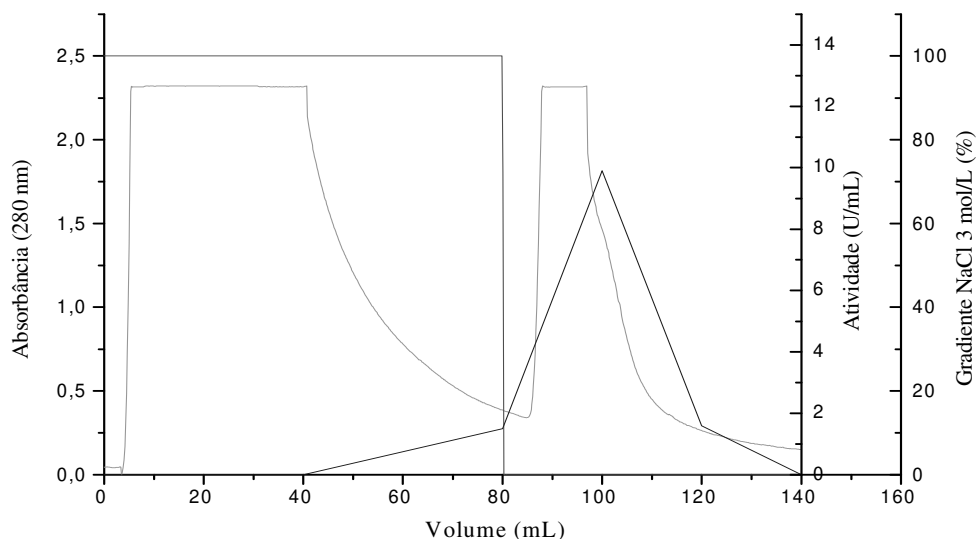


Figura 3: Cromatograma da purificação de lipase obtida com meio não clarificado contendo Prodex-lac[®], em coluna cromatográfica de 10 cm de altura, utilizando 3,0 mol/L de NaCl na fase móvel .

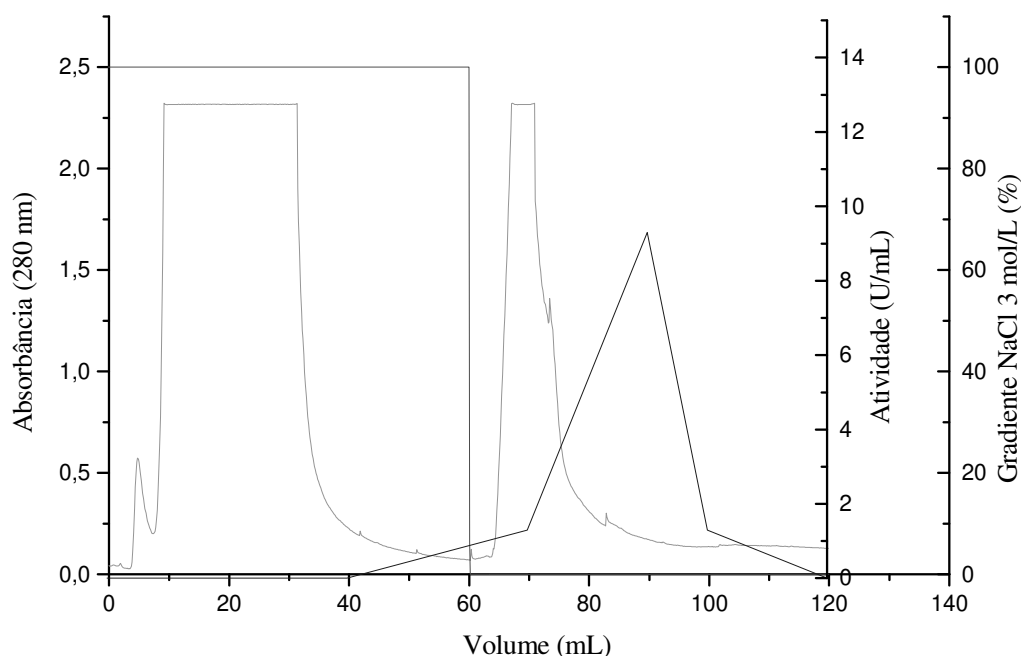


Figura 4: Cromatograma da purificação de lipase obtida com meio não clarificado contendo água de maceração de milho, em coluna cromatográfica de 10 cm de altura, utilizando 3,0 mol/L de NaCl na fase móvel.

CONCLUSÕES

Para se atingir os mesmos níveis de atividade enzimática com a água de maceração de milho clarificada é preciso haver um aumento da concentração, pois o tratamento com carvão ativado pode retirar do meio, além de contaminantes e de substâncias inibidoras indesejáveis, alguma quantidade de certos nutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo. Neste estudo houve um aumento de 50% na quantidade de água de maceração de milho utilizada para obtenção da enzima com mesmo nível de atividade do meio não clarificado. Considerando que o custo deste substrato é muito baixo, o aumento na concentração utilizada não é significativo porque as impurezas retiradas do meio de fermentação viabilizam a etapa de purificação (downstream), que é a etapa de custo mais elevado na obtenção industrial da enzima.

Os testes para a purificação da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 obtida com os dois meios estudados neste trabalho, revelaram uma enzima com características próximas às características das enzimas estudadas no estado bruto.

Os valores de recuperação enzimática obtidos estão acima dos valores obtidos na literatura consultada. Mendieta (1999) utilizando o mesmo processo sem, no entanto, realizar o pré-tratamento da água de maceração de milho para adição no meio de cultivo, obtendo uma recuperação enzimática de no máximo 68% e um fator de purificação de 39 vezes.

Utilizando-se tampão fosfato 0,01 mol/L a pH 7,0 adicionado de NaCl 3mol/L como fase móvel (concentração otimizada levando-se em consideração os resultados obtidos com os dois meios), os valores de recuperação enzimática e fator de purificação foram 96% e 44,3 vezes, respectivamente, utilizando o meio clarificado e 94,3% e 86,7 vezes, respectivamente, para o meio não clarificado. Estes resultados apresentam elevados valores tanto de recuperação enzimática como de fator de purificação, demonstrando que estas condições de processo são excelentes para purificação desta lipase.

As enzimas purificadas, obtidas a partir de meios industriais, têm elevada recuperação e características similares às enzimas obtidas no estado bruto, o que torna o processo uma opção mais econômica para a produção de lipase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Burket, J.F.M.; Maldonado, R.R.; Maugeri Filho, F.; Rodrigues, M.I. (2001), Caracterização Bioquímica da Lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552. In *IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas, p.162.
- Castro, H.F.; Anderson, W.A. (1995), Fine chemicals by biotransformation using lipases. *Química Nova*, São Paulo, v.18, n.6, p.544-554.
- Hatzinikolaou, D.G.; Macris, J.B.; Christakopoulos, P.; Kekos, D.; Kolisis, F.N.; Fountoukidis (1996), Production and partial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. *Biothechnology Letters*, London, v.18, n.5, p.547-552.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farrar, A.L.; Randall, R.J. (1951), Protein measurement with the folin-phenol reagent *Journal of Biological Chemistry*, v.193, 256-275.

Maldonado, R.R; Burket, J.F.M; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2002), Estudo da Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 em frascos agitados utilizando meio industrial. *VII SHEB*, Maringá, Paraná.

Maldonado, R.R; Burket, J.F.M; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2003), Produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 utilizando fontes alternativas de nitrogênio. *XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, Florianópolis, Santa Catarina.

Mendieta, O.W. (1999), Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica. *Tese doutorado*, FEA – UNICAMP.

Treichel, H. Estudo da produção e purificação da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 utilizando meios industriais. *Tese doutorado* FEA, UNICAMP, 2004.

CAPÍTULO VIII

DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E pH ÓTIMOS DAS LIPASE BRUTA E PURIFICADA DE *Geotrichum candidum* OBTIDAS COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Rafael Resende Maldonado, Eduardo Luiz Pozza, Francisco Maugeri e Maria Isabel
Rodrigues

Universidade Estadual de Campinas – Depto. de Engenharia de Alimentos
Laboratório de Engenharia de Bioprocessos
Caixa Postal 6121 – 13083-862 – Campinas/SP - E-mail: ratafta@fea.unicamp.br

Artigo apresentado no **XV Simpósio Nacional de Fermentações** (Sinaferm) realizado em
agosto de 2005 em Recife/PE, publicado nos Anais do evento na forma de CD.

RESUMO

*A utilização de lipase de origem microbiológica vem se expandindo em diversos setores industriais nos últimos anos, principalmente devido a principal característica deste tipo de enzima que é catalisar a reação de hidrólise de lipídios transformando-os em subprodutos como ácidos graxos livres, monossacarídeos, dissacarídeos e glicerol. O estudo da temperatura e pH ótimos de uma enzima são fundamentais para sua aplicação em diferentes tipos de processos. Uma determinada enzima pode exibir diferentes comportamentos de acordo com o substrato, temperatura e pH em que atua. No entanto, além disso, a maneira como a enzima é obtida também pode influenciar sua atuação. Este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com dois meios complexos contendo diferentes fontes de nitrogênio (um contendo Prodex-lac[®] e outro água de maceração de milho). O estudo foi feito com a enzima bruta e também com a enzima purificada. O pH ótimo de atuação das 4 enzimas analisadas foi em torno de 7,0 e a temperatura ótima variou na faixa de 37 a 47° C.*

INTRODUÇÃO

A grande versatilidade nas aplicações industriais de lipases leva a necessidade de se estudar as características deste grupo de enzimas, pois lipases obtidas de diferentes fontes podem exibir diferentes propriedades, especialmente em relação a temperatura e pH ótimo de atuação. A utilização de diferentes substratos para obtenção de lipases, ainda que se utilize um mesmo microrganismo para sua obtenção também pode alterar as propriedades e a especificidade desta enzima.

Burkert *et al.* (2001) realizaram a caracterização da lipase em caldo bruto de *Geotrichum candidum* NRRLY-552 produzida em meio sintético (3,58% de peptona e 0,64% de óleo de soja). Esta apresentou atividade ótima de 26 U/mL em pH 7,0 (tampão fosfato) a 37°C, maior estabilidade a 30°C e pH 7,0 e menor a 50°C e pH 7,0 com meia-vida de 38,51 e 0,03 h, respectivamente. Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ obtidos foram de 28,73 mg/mL e 22,57 U/mL, respectivamente.

Mendieta (1999) observou que lipases de *Geotrichum sp.* obtidas utilizando meio de fermentação contendo 5% de água de maceração de milho, 0,5% de nitrato de amônio e 1% de óleo oliva apresentavam maior estabilidade durante o armazenamento congelado.

A lipase extracelular de *Bacillus stearothermophilus* MC 7 foi purificada em eletroforese de gel e sua máxima atividade enzimática foi obtida na faixa de 75 a 80°C e o tempo de meia-vida de 30 minutos a 70°C. (Kambourova *et al.*, 2003).

Schuepp *et al.* (1998) obtiveram e caracterizaram lipases intra e extracelulares de *Pseudomonas fragi* CRDA 037. A faixa de pH ótimo para ambas as lipases foi de 8,7 a 9,0.

Lipase de *Aeromonas sobria* LP004, isolada do leite cru, foi purificada e caracterizada. A máxima atividade lipolítica foi obtida com o binômio de 45°C e pH 6,0. A enzima mostrou-se estável em pH alcalino na faixa de 6,5 a 10. (Lotrakul & Dharmsthiti, 1997).

Este trabalho teve por objetivo investigar a influência da temperatura e do pH da lipase obtida por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 utilizando diferentes substratos, visto que existe uma grande variação na atividade enzimática de diferentes lipases devido a ação destes dois fatores. Este trabalho ainda procurou investigar as modificações na temperatura e pH ótimos de atuação das mesmas lipases após processo de purificação, que também pode gerar alterações significativas na atuação da enzima.

MATERIAS E MÉTODOS

Produção da enzima

As lipases foram obtidas utilizando *Geotrichum candidum* NRRL Y-522 a partir de dois meios complexos previamente otimizados por Maldonado *et al.* (2003). Um meio continha 3,5% de Prodex-lac[®] (hidrolisado protéico) e 0,7% de óleo de soja e o outro meio 12% de água de maceração de milho previamente clarificada com carvão ativo e 0,6% de óleo de soja. A fermentação foi realizada em frascos agitados por 48 horas a 30°C e 250 rpm, com pH inicial do meio igual a 7,0. As enzimas foram congeladas e analisadas posteriormente.

Purificação da enzima

As lipases purificadas foram obtidas, a partir das lipases brutas produzidas com os dois meios citados anteriormente, através de cromatografia de interação hidrofóbica utilizando resina Buthyl Sepharose, segundo metodologia descrita por Mendieta (1999).

Determinação da temperatura e pH ótimos

As quatro lipases analisadas (lipase bruta e purificada obtida com Prodex-lac[®] e lipase bruta e purificada obtidas com água de maceração de milho) foram caracterizadas quanto a temperatura e pH através de planejamento experimental completo $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 pontos centrais. A temperatura foi estudada na faixa de 27 a 47°C e o pH na faixa de 6,0 a 8,0. Os resultados obtidos foram utilizados para obtenção de um modelo de segunda ordem que descrevesse a atividade lipolítica em função da temperatura e do pH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases brutas

Para a determinação da influência da temperatura e do pH na atividade lipolítica da lipase bruta obtida com água de maceração milho e com Prodex-lac[®] foram realizados dois planejamentos experimentais completos $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 pontos centrais. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Resultados obtidos no planejamento experimental completo com lipase bruta obtida com meio clarificado contendo água de maceração de milho ou com meio contendo Prodex-lac[®]

<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Atividade (U/mL) para lipase obtida com AMM*</i>	<i>Atividade (U/mL) para lipase obtida com Prodex-lac[®]</i>
1	30 (-1)	6,3 (-1)	8,70	12,82
2	44 (+1)	6,3 (-1)	11,17	15,61
3	30 (-1)	7,7 (+1)	10,63	19,74
4	44 (+1)	7,7 (+1)	13,72	13,47
5	27 (-1,41)	7,0 (0)	9,15	10,44
6	47 (+1,41)	7,0 (0)	17,52	18,76
7	37 (0)	6,0 (-1,41)	11,02	11,84
8	37 (0)	8,0 (+1,41)	11,60	21,38
9	37 (0)	7,0 (0)	12,52	29,96
10	37 (0)	7,0 (0)	13,55	27,68
11	37 (0)	7,0 (0)	12,65	26,86

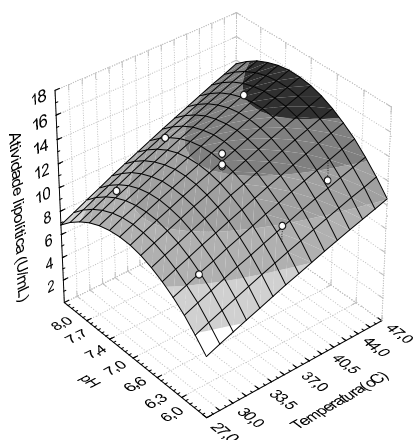
*água de maceração de milho

A máxima atividade lipolítica da enzima produzida com Prodex-lac[®] foi obtida nos ensaios do ponto central, com temperatura de 37° C e tampão fosfato 0,01 mol/L pH 7,0, alcançando valores em torno de 27 U/mL. Valores iguais a esses de temperatura e pH ótimo já haviam sido observados por Burkert et al. (2001) para a lipase bruta de *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 obtida com meio sintético, utilizando peptona como fonte de nitrogênio.

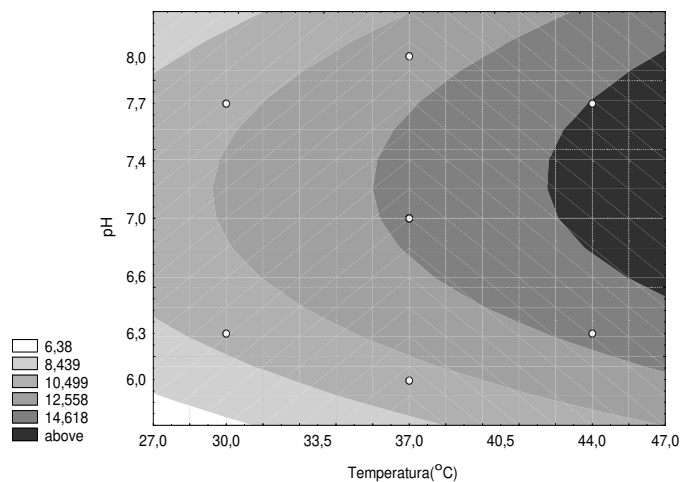
Observando a tabela 1 ainda é possível perceber que a maior atividade lipolítica da enzima produzida com meio clarificado de água de maceração de milho foi obtida no

ensaio 6, no qual utilizou-se meio reacional com tampão fosfato pH 7,0 e temperatura de determinação da atividade enzimática de 47°C.

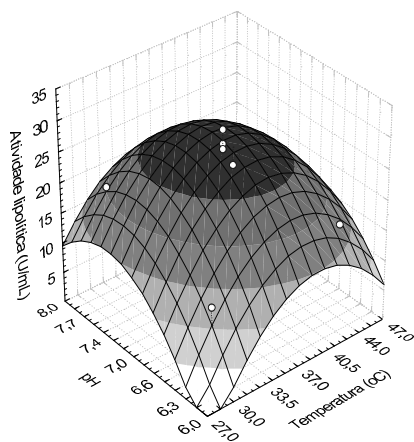
A partir dos dados experimentais foi feita a análise de variância (ANOVA) para cada planejamento. Em ambos os casos o valor do F calculado foi superior ao F tabelado a 95% de confiança e o coeficiente de correlação (R) foi superior a 0,9. Sendo assim foi possível obter um modelo de 2^a. ordem, estatisticamente significativo e preditivo para atividade lipolítica em função da temperatura e do pH. As superfícies de respostas para os modelos obtidos estão apresentadas na figura 1.



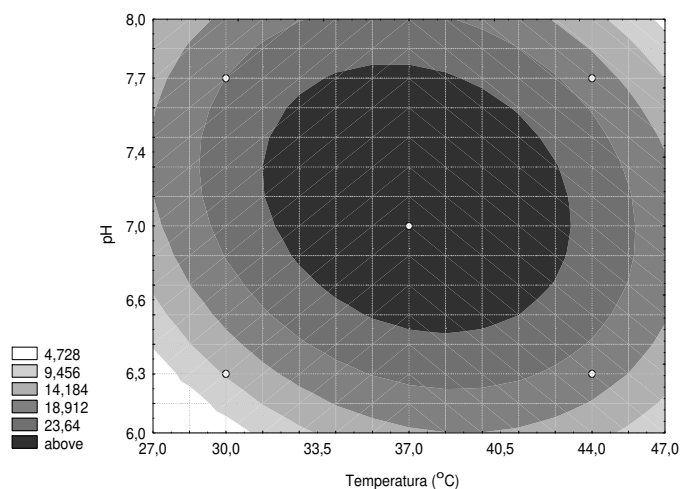
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1 – (a) Superfície de resposta (b) curva de contorno para atividade lipolítica em função da temperatura e pH da lipase bruta obtida com meio clarificado contendo água de maceração de milho (c) Superfície de resposta (d) curva de contorno para atividade lipolítica em função da temperatura e pH da lipase bruta obtida com meio contendo Prodelac[®]

Os valores obtidos para pH ótimo, em ambos os casos, igual a 7,0, já haviam sido obtidos para lipase de *Penicillium restrictum* por Freire *et al.* (1997) em meio sintético e para lipase de *Geotrichum candidum* NRRL- Y552 por Burkert *et al.* (2001) utilizando também com meio sintético.

Com relação à temperatura ótima nota-se que o meio contendo água de maceração de milho clarificado deu origem a uma enzima mais estável a temperatura, apresentando uma temperatura ótima de 47° C contra 37°C obtida para a lipase bruta produzida com Prodelac[®] neste trabalho e da lipase bruta obtida com meio sintético por Burkert *et al.* (2001). Tal fato demonstra que as alterações na composição do meio ocorridas devido com à clarificação causaram uma mudança de comportamento da enzima em relação a temperatura ótima. A remoção de substâncias inibidoras ou a mudança na conformação da

enzima são hipóteses que poderiam explicar esta alteração na temperatura ótima de atuação da enzima.

Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases purificadas

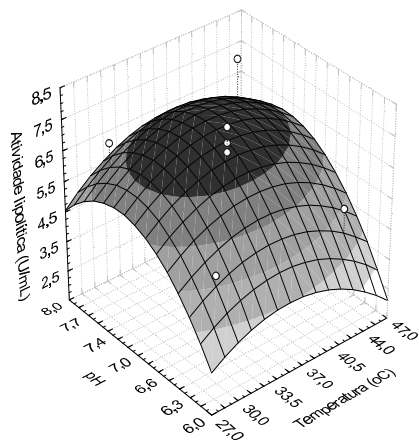
As lipases purificadas obtidas com as duas fontes de nitrogênio foram também analisadas em dois planejamentos experimentais completos $2^2 + 4$ pontos axiais + 3 pontos centrais. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados obtidos no planejamento experimental completo com lipases purificadas utilizando água de maceração de milho ou Prodex-lac[®] como fonte de nitrogênio.

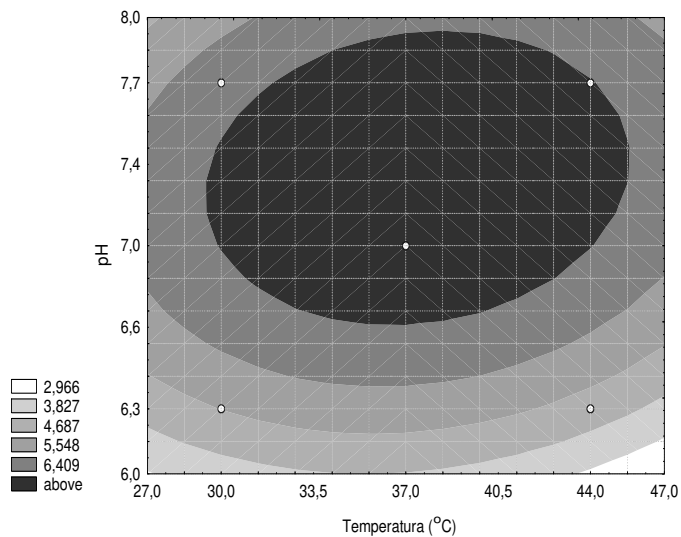
<i>Ensaio</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>Atividade (U/mL) para lipase obtida com AMM*</i>	<i>Atividade (U/mL) para lipase obtida com Prodex-lac[®]</i>
1	30 (-1)	6,3 (-1)	5,05	7,16
2	44 (+1)	6,3 (-1)	5,10	6,00
3	30 (-1)	7,7 (+1)	6,82	8,53
4	44 (+1)	7,7 (+1)	7,68	6,98
5	27 (-1,41)	7,0 (0)	5,32	7,34
6	47 (+1,41)	7,0 (0)	4,66	8,68
7	37 (0)	6,0 (-1,41)	3,27	5,93
8	37 (0)	8,0 (+1,41)	5,11	9,42
9	37 (0)	7,0 (0)	7,03	8,92
10	37 (0)	7,0 (0)	6,73	9,49
11	37 (0)	7,0 (0)	7,53	9,89

Analizando os resultados da tabela 2 é possível perceber que ambas as lipase obtidas têm um máximo de atividade enzimática bem próximo e que estes valores são atingidos nas condições do ponto central, de temperatura de 37° C e pH 7,0. É interessante notar que estas lipases mantêm as mesmas características ótimas de atuação, mesmo após a purificação. Comparando as lipases brutas obtidas com peptona (Burkert et *al.*, 2001), com Prodex-lac[®] e água de maceração de milho (neste trabalho) e as duas lipases purificadas, obtidas com estes dois meios industriais também, apenas a lipase bruta obtida com água de maceração de milho teve um comportamento destoante das demais, com um aumento de 10°C na temperatura ótima. Isto mostra que a enzima não sofreu grandes modificações no processo de purificação.

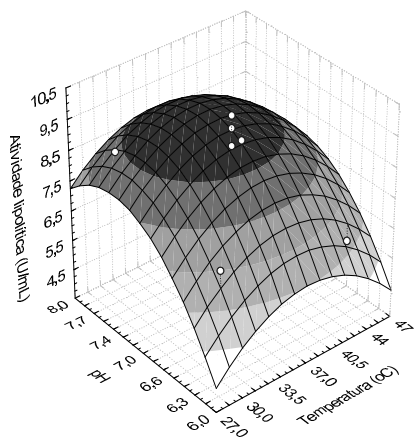
As superfícies de resposta obtidas para as lipases purificadas estão apresentadas na figura 2.



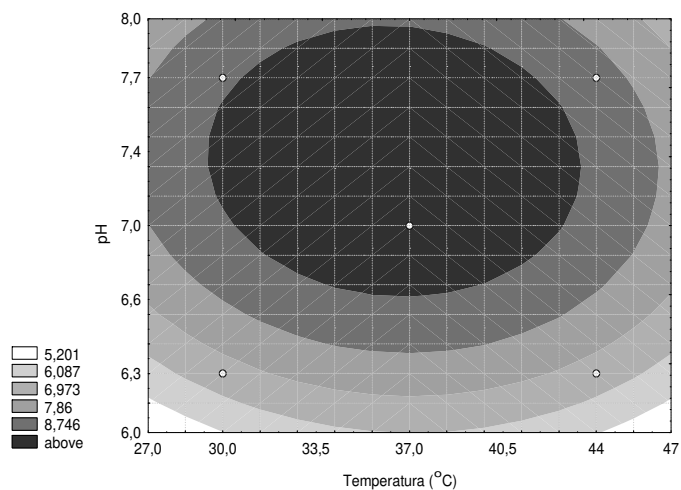
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2 – (a) Superfície de resposta (b) curva de contorno para atividade lipolítica em função da temperatura e pH da lipase purificada obtida com meio clarificado contendo água de maceração de milho (c) Superfície de resposta (d) curva de contorno para atividade lipolítica em função da temperatura e pH da lipase purificada obtida com meio contendo Prodex-lac®

CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível determinar as características de quatro lipases (duas brutas e duas purificadas) de *Geotrichum candidum* NRRL Y -552 obtidas com meios industriais. As enzimas são muito similares entre si, demonstrando que o processo de purificação altera pouco as características da enzima. Outro fato interessante é que a lipase bruta obtida com meio clarificado contendo água de maceração de milho mostrou-se termicamente mais ativa a uma temperatura de 47° C, o que é interessante, pois dependendo da fonte de nutriente utilizada na produção ocorrem alterações na enzima, o que pode levar a outras aplicações para enzimas obtidas de um mesmo microrganismo. O aumento da temperatura ótima é interessante, uma vez que aumenta o campo de aplicação da enzima para processos que necessitam de temperaturas mais altas de processamento.

Referências

1. Burkert, J.F.M. Maldonado, R.R; Maugeri, F. e Rodrigues, M.I.(2001) Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552, in Caderno de Resumos do IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, p.162.
2. Freire, D.M; Teles, E.M.F; Bom, E.P.S.; Lippel Sant'anna G.(1997) Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Totowa, v.63-65, p.409-421.
3. Kambourova, M.; Kirilova, N.; Mandeva, R. e Derekova, A.(2003), Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 22, nº. 6, pag. 307-313.
4. Lotrakul, P. e Dharmsthiti, S. (1997), Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sobria* LP004, *Journal of Biotechnology*, vol. 54, nº2, pag. 113-120.
5. Mendieta, O.W (1999); Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
6. Maldonado,R.R; Burkert, J.F.M; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2003) Produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552 utilizando fontes alternativas de nitrogênio. XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis, Santa Catarina.
7. Schuepp, C.;Kermasha, S.;Michalski, M-C. e Morin, A. (1998), Production, partial purification and characterisation of lipases from *Pseudomonas fragi* CRDA 037, *Process Biochemistry*, vol. 32, nº6, pag. 225-232.

CAPÍTULO IX

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE *Geotrichum candidum* OBTIDA COM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Rafael Resende Maldonado¹, Eduardo Luiz Pozza¹, Janaína Fernandes Medeiros Burkert²,
Fátima Aparecida Almeida Costa¹, Francisco Maugeri¹ e Maria Isabel Rodrigues¹

¹ Universidade Estadual de Campinas – Depto. de Engenharia de Alimentos

Laboratório de Engenharia de Bioprocessos

Caixa Postal 6121 – 13083-862 – Campinas/SP - E-mail: ratafta@fea.unicamp.br

² Universidade Federal do Rio Grande – Faculdade de Engenharia Química

**Artigo elaborado para submissão à análise da revista *Ciência e Tecnologia de
Alimentos da SBCTA***

RESUMO

A utilização de enzimas em processos industriais é de extrema importância nos dias atuais, isto se deve a dois fatores principais: facilidade de obtenção das enzimas por via biotecnológica e as vantagens que as enzimas apresentam em relação a catálise química (maior especificidade e menor consumo energético). A forma de obtenção de uma enzima pode alterar importantes características, como estabilidade térmica, constantes cinéticas, temperatura e pH ótimo de atuação. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo comparativo entre lipases de *Geotrichum candidum*, obtidas a partir de três fontes de nitrogênio distintas: peptona, hidrolisado de levedura (Prodex-lac[®]) e água de maceração de milho clarificada. As lipases obtidas foram analisadas quanto a estabilidade térmica, estabilidade em relação ao pH e ao congelamento, valores das constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$, energia de ativação (E_a) e da energia de desativação (E_d). A determinação destes parâmetros foi útil para verificar que há uma influência importante da fonte de nitrogênio sobre as características da lipase. Também foi possível observar que a lipase obtida com água de maceração de milho apresentou características diferenciadas das outras lipases, o que pode lhe permitir uma gama maior de aplicações.

SUMMARY

Lipase application on different industries is very important nowadays. This fact is consequence of two important characteristics of enzymes: facility to obtain enzyme for microorganism and the advantages that enzymes have than chemical catalyze (higher specificity and lower energy consume). The process for enzyme production can change protein characteristic as thermo stability, kinetic parameters, optimal temperature and pH. The aim of this work was made a comparative study between lipases of *Geotrichum candidum* obtained from different nitrogen sources (peptone, yeast hydrolizate and clarificated corn steep liquor). Thermo stability, pH-stable, kinetics parameters K_m e V_{max} , denaturation energy and activation energy were measured for the studied lipases. The parameters determinated were important to verify that nitrogen source have a significant influence on lipase characteristic and it can be seen that lipase obtained using clarificated corn steep liquor have different characteristic than lipases obtained using yeast hydrolizate and peptone, that what possibility a biggest number of application to this lipase.

1- INTRODUÇÃO

Lipases compreendem um grupo de enzimas (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) encontradas comumente em vegetais, animais e triglicerídeos, fornecendo ácidos graxos livres, diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e glicerol. Essa reação é reversível e, portanto essas enzimas catalisam a formação de acilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo-água [5].

Muitos trabalhos citados na literatura relatam características de enzimas obtidas de diferentes formas e pelos mais variados microrganismos. A lipase de *Galactomyces geotrichum* obtida com meio contendo óleo de oliva apresentou atividade máxima em pH 7,75 e 30°C e mostrou-se pouco estável na temperatura de 56°C, não qual perdeu toda atividade após incubação por 35 minutos [14].

A lipase purificada de *Geotrichum candidum* apresentou-se estável na faixa de pH de 6 a 8 e pH ótimo de 6 a 6,8 [17]. Já a lipase de *Geotrichum* sp. purificada por fracionamento com sulfato de amônia e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex A-50 apresentou atividade ótima na faixa de pH entre 5 e 8 à 45°C [8]. Uma esterase termoestável foi obtida a partir de *Bacillus* sp. com atividade máxima obtida em pH 6,0 à 65°C. Esta enzima mostrou atividade residual de 70% após 1h de incubação e de 50% após 10 horas de incubação na temperatura ótima e a 40°C reteve 83% da atividade inicial após 100 horas de incubação [1].

Lipase de *Penicillium restrictum* incubada com diferentes tampões, em diferentes faixas de pH apresentou maior atividade enzimática em tampão fosfato pH 5,5 [4]. Valores dos parâmetros cinéticos da lipase de *Penicillium restrictum* foram determinados em um outro trabalho [6]. Para tributirina, óleo de babaçu e óleo de oliva, os valores de K_M e $V_{máx}$ obtidos foram de 5,1 mg/mL e 4,88 U/mL; 13,9 mg/mL e 13,1 U/mL; 21,56 mg/mL e 11,2 U/mL, respectivamente. Lipase de *Antrodia cinamommea* foi purificada por fracionamento com sulfato de amônia e cromatografia em coluna DEAE-Sephadex e, apresentou-se estável na faixa de temperatura de 25 a 60°C, com temperatura ótima de 45°C [16].

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

A caracterização parcial da lipase bruta de *Geotrichum candidum* obtida com diferentes fontes de nitrogênio (peptona, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho clarificada) feita analisou a estabilidade em relação à temperatura, ao pH e ao congelamento; as constantes cinéticas K_m e $V_{máx}$; a meia-vida, a energia de ativação e desativação.

2.1 - Obtenção das enzimas

As lipases foram obtidas após 48 horas de fermentação em frascos agitados a 30°C e 250 rpm de agitação, segundo os meios otimizados: 3,6% de peptona e 0,6% de óleo de soja [2], 3,5% hidrolisado de levedura e 0,7% de óleo de soja [12] e 12,0% de água de maceração de milho clarificada e 0,6% de óleo de soja [15]. As fermentações foram realizadas em frasco de 500mL, com volume útil de 100 mL, sendo utilizado 10% v/v de inóculo, preparado segundo procedimento previamente otimizado [9].

2.2- Estabilidade térmica

A estabilidade térmica em função da temperatura foi determinada incubando-se amostras da enzima, adicionada de solução tampão fosfato pH=7,0, a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 e 60°C). Amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e a atividade lipolítica foi analisada segundo metodologia utilizada para determinação de atividade lipolítica com outro tipo de microrganismo [4]. A atividade enzimática foi determinada com temperatura da reação enzimática a 37°C. A partir destes ensaios foi possível determinar os valores da energia de desativação (E_d) e a meia-vida ($t_{1/2}$) para cada enzima em cada uma das temperaturas investigadas.

Amostras das enzimas foram submetidas ao congelamento e tiveram a atividade enzimática analisada ao longo do tempo para determinação da estabilidade à temperatura de estocagem.

2.3-Estabilidade em relação ao pH

Para determinação da estabilidade ao pH, todas as amostras de enzimas foram incubadas a 30°C a diferentes valores de pH (6,0 a 8,0). As amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo e analisadas de acordo com a metodologia citada anteriormente [4].

2.4-Determinação da energia de ativação

Para determinação do valor da energia de ativação (E_a) realizou-se a reação enzimática a diferentes temperaturas (27 a 47°C) com enzima obtida diretamente do caldo fermentado.

2.5-Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}

A determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max} foram realizadas variando-se a concentração do substrato para a reação enzimática (óleo de oliva). A faixa escolhida para determinação das constantes cinéticas foi de 8 a 100 g/L de óleo de oliva adicionado ao meio reacional.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1-Estabilidade térmica e estabilidade ao congelamento

Lipases obtidas a partir de peptona, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho clarificada foram incubadas em diferentes temperaturas para determinação da estabilidade térmica e em relação ao congelamento. A partir dos resultados obtidos foram determinadas a constante de desativação (K_d) e a meia-vida ($t_{1/2}$) para cada temperatura analisada. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores experimentais da constante de desativação (K_d) e da meia-vida ($t_{1/2}$) para lipase de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio em função da temperatura (pH = 7,0)

Temperatura de incubação (°C)	Peptona		Hidrolisado de levedura		Água de maceração de milho clarificada	
	$K_d (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	$K_d (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	$K_d (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$
25	-	-	0,003	203,88	0,01	61,90
30	0,02	38,50	0,03	24,15	0,03	22,65
37	0,19	3,61	0,16	4,44	0,04	16,40
40	0,89	0,77	0,19	3,73	0,10	7,17
45	4,42	0,16	0,51	1,36	0,44	1,56
50	22,02	0,03	6,91	0,10	4,30	0,16
60	-	-	14,64	0,05	16,35	0,04
	$t_{1/2}$ (meses)		$t_{1/2}$ (meses)		$t_{1/2}$ (meses)	
Congelamento	8,0		14,4		46,2	

A análise comparativa da tabela 1 mostra que a lipase de *Geotrichum candidum* perde estabilidade em temperaturas superiores a 37°C, com valores de meia-vida que diminuem consideravelmente com o aumento da temperatura. Esta constatação indica que aplicações em sistemas a temperaturas mais elevadas não seriam viáveis com este tipo de enzima.

Na faixa entre 25 e 37°C, as três enzimas apresentam uma relativa estabilidade e a fonte de nitrogênio tem influência sobre este fator. A lipase obtida com hidrolisado de levedura é bastante estável a 25°C, com meia vida de aproximadamente 8,5 dias, no entanto a 30°C este valor reduz-se para 1,0 dia. Por sua vez, a lipase obtida com água de maceração de milho clarificada é menos estável a 25°C (meia vida de 2,6 dias), mas tem um declínio da estabilidade menos acentuado, apresentando uma meia vida de 7,17 horas à 40°C. A enzima obtida com peptona apresenta valor de meia-vida comparativamente maior a 30°C, mas perde bastante estabilidade em temperaturas maiores ou iguais a 37°C.

Em relação à estabilidade da enzima congelada, observa-se que a enzima obtida com água de maceração de milho é consideravelmente mais estável, com uma meia vida

83% superior comparada a lipase obtida com peptona e 68% maior que a lipase obtida com hidrolisado de leveduras. A melhor estabilidade térmica da lipase obtida com água de maceração de milho clarificada pode estar relacionada com alterações provocadas pelo processo de clarificação e pela composição da água de maceração de milho.

Outros autores verificaram uma maior estabilidade nas lipases obtidas com água de maceração de milho em relação a outros substratos. A temperatura ótima da lipase de *Geotrichum candidum* obtida com água de maceração de milho clarificada foi 10°C superior em comparação com a lipase obtida com hidrolisado de levedura e peptona [15], no entanto após purificação da enzima, não se verificou mais diferença entre a temperatura ótima das lipases obtidas com diferentes fontes de nitrogênio [11].

A lipase de *Geotrichum sp.* obtida com água de maceração de milho mostrou-se mais estável ao congelamento do que as obtidas com outras fontes de nitrogênio[7,13].

3.2 - Estabilidade em relação ao pH

Lipases obtidas a partir de peptona, hidrolisado de levedura e água de maceração de milho clarificada foram incubadas em diferentes pH para determinação da estabilidade em relação ao pH. A partir dos resultados obtidos foram determinadas a constante de desativação (K_d) e a meia-vida ($t_{1/2}$) para cada valor de pH analisado analisada. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Valores experimentais da constante de desativação (K_d) e da meia-vida ($t_{1/2}$) para lipase de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio em função do pH à temperatura de 30°C.

pH de incubação	Hidrolisado de levedura		Água de maceração de milho clarificada	
	$K_d (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$	$K_d (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$
6,0	0,014	49,51	0,019	40,30
7,0	0,015	47,48	0,017	40,07
8,0	0,124	5,61	0,021	32,54

No caso do substrato hidrolisado de levedura, nota-se uma perda da estabilidade em pH 8,0. Este fato já havia sido observado anteriormente para lipase de *Geotrichum candidum* obtida com peptona, que apresenta um declínio rápido da atividade lipolítica em pH maior ou igual a 8,0 [3]. Estudos da produção em reator air-lift mostraram também um declínio rápido da atividade lipolítica quando o pH do meio de fermentação atingia níveis maiores do que 8,0 [10]. No entanto, em relação a lipase obtida com água de maceração de milho clarificada, nota-se uma menor influência do pH sobre a perda da atividade lipolítica na faixa estudada, com uma meia-vida cerca de 6 vezes maior em pH 8,0 comparada com a enzima obtida com hidrolisado de levedura. Isto confirma que a lipase obtida com este substrato é mais estável não apenas em relação à temperatura, mas também em relação ao pH, como já fora observado por outros autores [7,13]. Tal verificação torna a utilização da enzima obtida com água de maceração de milho clarificada potencialmente interessante ao se pensar em aplicações da em faixas mais amplas de temperatura e pH.

3.3- Determinação da energia de ativação e desativação

A partir da análise da estabilidade térmica e da variação da temperatura de realização enzimática foi possível determinar os valores da energia de desativação (E_d) e da energia de ativação (E_a), respectivamente, para as lipases obtidas com os diferentes substratos (tabela 3).

Tabela 3 – Valores experimentais da energia de desativação (E_d) e da energia de ativação (E_a) para lipase de *Geotrichum candidum* obtida com diferentes fontes de nitrogênio

<i>Fonte de nitrogênio</i>	<i>Energia de ativação (kcal/mol)</i>	<i>Energia de desativação (kcal/mol)</i>
Peptona	10,85	78,90
Hidrolisado de levedura	6,97	33,47
Água de maceração de milho clarificada	5,23	43,50

Dos resultados obtidos observa-se que a substituição da peptona por fontes de nitrogênio alternativas provoca uma diminuição tanto na energia de desnaturação como na energia de ativação da lipase. Comparativamente isto significa que a uma mesma

temperatura a reação enzimática é mais favorecida para lipase obtida a partir da água de maceração de milho clarificada, pois exige uma menor energia de ativação. Em relação à desnaturação, a lipase obtida com hidrolisado de levedura é a de mais fácil desnaturação, isto pode explicar a redução tão brusca na meia-vida de enzima obtida com hidrolisado de levedura quando a temperatura de incubação varia de 25 para 37°C. No entanto, tal fator não explica o comportamento da lipase obtida com peptona. Provavelmente o comportamento da lipase obtida com este substrato sofre influência de outros fatores que levam a uma desnaturação mais rápida da enzima a partir de 37°C, mesmo necessitando de uma energia de desnaturação mais elevada.

3.4- Determinação das constantes cinéticas K_m e V_{max}

A tabela 4 apresenta os valores das constantes cinéticas K_m e V_{max} para as três lipases estudadas. Os valores das constantes cinéticas foram determinados variando-se a concentração do substrato na reação enzimática. O substrato utilizado neste caso foi o óleo de oliva.

Tabela 4 – Valores das constantes cinéticas K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para lipases de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio

<i>Fonte de nitrogênio</i>	K_m (mg/mL)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mL)
Peptona	28,73	22,57
Hidrolisado de levedura	37,34	37,31
Água de maceração de milho clarificada	94,93	37,59

Comparando-se as três lipases, observa-se um grande aumento no valor de K_m para a lipase obtida com água de maceração de milho clarificada, o que implica que esta enzima consegue atuar eficientemente mesmo em concentrações mais elevadas do substrato. Esta constatação é interessante, pois a enzima obtida com água de maceração de milho clarificada possui uma série de características distintas em relação às outras duas lipases obtidas, o que reforça o fato de ela poder ter aplicações diferenciadas. Em relação ao valor de $V_{m\acute{a}x}$ observa-se que as lipases obtidas com meios industriais apresentam maior atividade máxima em relação a lipase obtida com peptona, o que demonstra que estes substratos são

potencialmente interessantes para a obtenção de níveis de atividade enzimática mais elevados em relação ao meio sintético, com um custo reduzido.

4-CONCLUSÃO

A partir deste estudo foi possível verificar que as características da lipase produzida por um mesmo microrganismo podem sofrer alterações em função do tipo de substrato utilizado na produção. Na comparação dos três substratos analisados foi possível perceber que a água de maceração de milho clarificada possibilitou a obtenção de uma lipase com características diferenciadas, tais como, menor variação na estabilidade térmica em temperaturas próximas à temperatura ótima, menor variação na estabilidade em função da variação do pH do meio, maior estabilidade ao congelamento, reduzido valor de energia de ativação da reação enzimática e valor de K_m consideravelmente maior. Estas características indicam que esta lipase pode ser aplicada em processos mais robustos, ou seja, com maior variação de temperatura, pH e concentração de substrato, comparativamente as lipases obtidas com peptona e com hidrolisado de levedura, bem como pode ser estocada por mais tempo em temperatura de congelamento.

Os resultados obtidos também demonstraram que para as três enzimas a faixa de temperatura de 25 a 37°C e valor de pH de 6,0 a 7,0 são as condições que proporcionam a manutenção da atividade enzimática por mais tempo.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATESLIER, Z.B.B. and METIN, K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme Microbiology Technology**, v.38, n.5, p.628-635, 2006.

- [2] BURKET, J.F.M. **Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552**. Campinas, 2003. 172p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

- [3] BURKERT, J.F.M. MALDONADO, R.R; MAUGERI, F. e RODRIGUES, M.I. Caracterização bioquímica da lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552, in Caderno de Resumos do **IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, p.162.,2002
- [4] FREIRE, D.M.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia, São Paulo**, v.28, n.1, p.6-12, 1997.
- [5] HATZINILOLAOU, D. G.; MACRIS, J.B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; FOUTOUKIDIS. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, London, v. 18, n. 5, p.547-552, 1996.
- [6] JESUS, M.F.C.P. BRANCO, R.N. SILVA JR. J.G; LIPPEL SANT'ANNA JR. G.L. FREIRE D.M.G. Lipases de *Penicillium restrictum*: estudo comparativo e caracterização de enzimas com diferentes graus de pureza. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 1999,v.16,n.2,p.113-118, Campinas.
- [7] KAMIMURA, E.S.; MEDIETA, O.; RODRIGUES, M.I. and MAUGERI, F. Studies of lipase-affinity adsorption using response surface analysis. **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v.33, p.153-159, 2001.
- [8] MACÊDO, G.A; PASTORE, G.M.; PARK, Y.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 90-95, 1997.
- [9] MALDONADO, R.R.; BURKERT, J.F.M.; COSTA, F.A.A.; MAUGERI, F. and RODRIGUES, M.I. Elucidation of the effects of inoculum size and age by optimization of lipase production by *Geotrichum candidum*, manuscript submitted for **Enzyme Microbiology Technology**, 2006.

- [10] MALDONADO, R.R.; POZZA, E.L.; COSTA, F.A.A.; MAUGERI, F. and RODRIGUES, M.I. Lipase production by *Geotrichum candidum* in air-lift and stirring fermenters using alternative nitrogen sources, manuscript submitted for **Journal Chemical Technology and Biotechnology**, 2006.
- [11] MALDONADO, R.R.; POZZA, E.L.; MAUGERI, F. and RODRIGUES, M.I. Determinação da temperatura e pH ótimos das lipases bruta e purificada de *Geotrichum candidum* obtidas com diferentes fontes de nitrogênio. . **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Ago, 2005.
- [12] MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F. and RODRIGUES, M. I. Estudo da produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552 em frascos agitados utilizando meios industriais, in **VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**, Dec, p 121, 2002.
- [13] MENDIETA, O.W. Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica. *Tese doutorado*, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- [14] PHILIPS, A.; PRETORIUS, G.H.J. Purification and characterization an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biotechnology Letters**, London, v.13, n.11, p.833-838, 1991.
- [15] POZZA, E.L.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI, F. and RODRIGUES, M.I. Estudo da etapa de *up stream* e purificação da lipase de *Geotrichum candidum* produzida com meios industriais. **XV Simpósio Nacional de Fermentações**, Ago, 2005.
- [16] SHU, C.-H.; XU C.-J. and LIN, G.-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v.41, n.3, p. 734-738, 2006.

[17] VEERARAGAVAN, K; COLPITTS, T.; GIBBS, B. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1044, n.1, p.26-33, 1990.

CAPÍTULO X – CONCLUSÕES

A partir da análise de todos os resultados obtidos ao longo deste trabalho foi possível chegar às seguintes conclusões:

- **Estudo do inóculo** – foi necessário estabelecer um procedimento experimental de obtenção do inóculo na produção de lipase por *Geotrichum candidum* que permitisse um aumento nos valores da atividade lipolítica e redução da variabilidade dos resultados. A técnica de planejamento fatorial foi útil para detectar que o processo não estava sob controle e que eram necessários estudos prévios à otimização. As condições ótimas de obtenção do inóculo foram obtidas com meio de inóculo contendo 5,0% de peptona, 0,1% de nitrato de sódio, 0,1% de sulfato de magnésio e 1,0% de óleo de soja, tempo de incubação do inóculo de 15 horas, pH inicial igual a 7,0, temperatura de 30°C, agitação de 250 rpm e adição de uma área circular de 0,79 cm² (d = 1,0 cm) de meio sólido contendo esporos do microrganismo. Estas condições permitiram controlar a variabilidade do processo em torno de 20% (resultado que pode ser considerado satisfatório por se tratar de um processo que utiliza um fungo filamentoso pluricelular, o que dificulta a padronização do inóculo) e um aumento de 4 a 5 vezes no valor da atividade lipolítica.
- **Estudo da composição dos meios de fermentação** – através da técnica do planejamento fatorial foi possível obter as condições otimizadas para dois meios de fermentação a partir de resíduos industriais. As condições ótimas foram 3,5% de hidrolisado de levedura (Prodex-lac[®]) e 0,7% de óleo de soja (meio 1) e 8,0% de água de maceração de milho e 0,6% de óleo de soja (meio 2), ambos com atividades lipolíticas em torno de 20 U/mL, valor 5 vezes maior do que valores citados na literatura para o mesmo microrganismo. Além disso, o estudo permitiu comprovar a viabilidade técnica e econômica da substituição da peptona, com significativa redução de custos (superior a 95%). No entanto, a utilização de resíduos industriais pode ser um elemento complicador na recuperação da enzima (etapa de *down stream*), por conterem muitas impurezas e material particulado.

- **Estudo da produção da lipase em reatores** – este trabalho permitiu comparar a performance de um reator de mistura convencional com um reator não convencional do tipo *air-lift* para produção de lipase. Ambos os reatores apresentaram resultados semelhantes de atividade lipolítica e a produtividade. Este fato é interessante, pois permite que o processo de obtenção da lipase possa ser realizado com um ou outro reator, proporcionando uma liberdade para escolha do equipamento mais adequado de acordo com a viabilidade econômica e operacional de cada sistema. Outra conclusão interessante foi a respeito da máxima atividade lipolítica e a máxima produtividade que na fermentação em reator *air-lift*, se deram em tempos de processo diferentes. Isto permite também uma maior liberdade no estabelecimento do processo industrial, podendo-se escolher qual a resposta mais conveniente. Processos com tempo longo promovem uma maior produção, enquanto que com um tempo reduzido obtém-se uma maior produtividade. Uma análise econômica do processo poderia ser feita para se encontrar o ponto ótimo na relação produção, produtividade e custo de processo.
- **Estudo do up stream e da purificação** – a dificuldade de recuperação da enzima do meio fermentado contendo resíduos industriais na etapa de *down stream* foi solucionada com um processo de clarificação prévia da água de maceração de milho. O processo de clarificação utilizou carvão ativo e a concentração ótima de água de maceração de milho foi reajustada para 12%, o que se deve ao fato da clarificação remover nutrientes do meio, além dos resíduos indesejáveis. Ao comparar-se a purificação da enzima obtida com um meio clarificado com a enzima de meio não clarificado, percebeu-se que havia uma dificuldade operacional maior para o segundo caso. Em relação à purificação, a cromatografia de interação hidrofóbica mostrou-se eficiente para a purificação da lipase, em condições ótimas utilizadas anteriormente para outras lipases, com bons níveis de recuperação enzimática e do fator de purificação.
- **Caracterização parcial da enzima** – o estudo comparativo realizado entre as lipases bruta e purificada, obtidas com diferentes fontes de nitrogênio, demonstrou que tanto a fonte de nitrogênio como o processo de purificação podem ter influência sobre as características de atuação da enzima. Além disso, foi possível verificar que

a lipase bruta obtida com água de maceração de milho clarificada apresentou uma série de características diferenciadas em relação às outras lipases. Esta apresentou uma temperatura ótima mais elevada, maior estabilidade térmica e em relação ao pH, maior estabilidade ao congelamento, menor energia de ativação e maior valor da constante cinética K_m . Todas estas características podem ser úteis em possíveis aplicações, pois esta enzima mostrou-se mais robusta do que as demais em relação a variações de temperatura, pH e concentração de substrato, bem como em relação ao tempo de estocagem.

De uma forma global foram obtidos resultados muito promissores de produção e purificação enzimática que proporcionam múltiplas possibilidades a serem exploradas na ampliação de escala do processo. Além disso, a utilização de resíduos industriais para obtenção de um bioproduto é importante no que diz respeito a agregação de valor econômico a estas matérias-primas e em relação a preservação do meio ambiente, ao ser dado um destino adequado a estes resíduos. Por fim, a obtenção de enzimas com características diferenciadas também é um importante resultado, uma vez que amplia a possibilidade de aplicações das mesmas.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo de aplicações para as lipases bruta e purificada;
- Aplicação do processo de produção para outros fungos filamentosos que apresentem potencial de produção de bioprodutos;
- Ampliação de escala dos processos de produção e purificação;
- Estudo das alterações na estrutura enzimática provocadas pela modificação na fonte de nitrogênio, pelo processo de clarificação prévia e pelo processo de purificação;
- Estudo piloto da produção da enzima.

CAPÍTULO XI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILLARGEON, M.W. Purification and specificity of lipases from *Geotrichum candidum*. **Lipids**, v. 25, n. 12, p. 841-848, 1990.
2. BRUSH, T.S.; CHAPMAN, R; KURZMAN, R; WILLIAMS, D.P. Purification and characterization of extracellular lipases of *Ophistoma piliferum*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.7, n.10. p. 2131-2138, 1999.
3. BURKERT, J.F.M.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M.I. **Caracterização Bioquímica da Lipase de *Geotrichum candidum* NRRLY-552**. In Caderno de Resumo do IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, p.162, Nov, 2001.
4. BURKERT, J.F.M.; MALDONADO, R.R.; RODRIGUES, M.I. Estudo da Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL Y-552, XIV **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Natal, RN, Agosto, 2002
5. BURKET, J.F.M. **Otimização das condições de produção de lipase por *Geotrichum candidum* NRRLY-552**. Campinas, 2003. 172p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas
6. BURKET, J.F.M.; MALDONADO, R.R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London, v.80, pg. 61-67, Jan, 2005.
7. BURKHOLDER, P.R.; SINNOT. E.W. **American Journal of Botanic**, v. 32, p.424, 1945.

8. CASTRO, H.F.; ANDERSON, W.A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, São Paulo, v.18, n.6, p.544-554, Nov/Dec, 1995.

9. CHEVALIER, P.; NOUE, J. Enhancement α -amylase production by immobilized *Bacillus subtilis* in an *airlift* fermenter. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.9, n., p.53-56, Jan, 1987.

10. CORDOVA, J.; NEMMAOUI, M.; ISMAÏLI – ALAOUI, M.; MORIN, A.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; BENJILALI, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.5, p.75-78, 1998.

11. DIOGO, M. M.; SILVA, S.; CABRAL, J.M.S.; QUEIROZ, J.A. Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on Sepharose. **Journal of Chromatography A.** , v.849, n.2, p.413-419, July, 1999.

12. FREIRE, D.M.; TELES, E.M.F.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA, G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v.63-65, p.409-421, Sept, 1997(a) .

13. FREIRE, D.M.; GOMES, P.M.; BON, E.P.S.; LIPPEL SAN'T ANNA Jr., G.L. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia, São Paulo**, v.28, n.1, p.6-12, 1997 (b).

14. GITLESEN, T.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica and Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1345, p.188-196, 1997.

15. HATZINIKOLAOU, D. G.; MACRIS, J.B.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.; KOLISIS, F.N.; FOUTOUKIDIS. Production and parcial characterization of lipase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, London, v. 18, n. 5, p.547-552, May, 1996.

16. IKEDA,S.; NIKAIDO, K.; ARAKI, K.; YOSHITAKE, H.K.; ATSUSHI, I. Production of recombinant human lysosomal acid lipase in *Schizosaccharomyces pombe*: development of a fed-batch fermentation and purification process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.98, n.7, p. 366-373, 2004.

17. JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.32, n.3, p.256-261, Dec, 1989 a.

18. JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.11, n.2, p. 90-95, Feb, 1989 b.

19. JIN, B.; LEEUWEN, H.J.V.; PATEL, B.; YU, Q. Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryza*. **Bioresource Technology**, v.66, p.201-206, 1998.

20. JIN, B.; LEEUWEN, H.J.V.; PATEL, B.; DOELLE, H.W.; YU, Q. Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater. **Process Biochemistry**, vol.34, n. 1, pg. 59-65, Jan, 1999.

21. KAMIMURA, E. S. ; MENDIETATABOADA, O. ; SATO, H. H. ; PASTORE, G. ; MAUGERI FILHO, F. . Production of Lipase from *Geotrichum* sp and Adsorption Studies on Affinity Resin. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n.2, p. 102-112, 1999.

22. KAMIMURA, E. S. ; MENDIETA, O. ; RODRIGUES, M. I. ; MAUGERI FILHO, F. . Studies on Affinity Adsorption Using Surface Response Analysis. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 33, p. 153-159, 2001.

23. KASENO e KOKUGAN, T. The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n.6, p.577-582, 1997.

24. KIM, S.W.; KANG, S.W.; LEE, J.S. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.59, n., p.63-67, 1997.

25. KIM, S.J. e SHODA, M. Batch decolorization of molasses by suspended and immobilized fungus of *Geotrichum candidum* Dec 1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.88, n.5, p.586-589, 1999.

26. KORDEL, M.; SCHMID, R.D. Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas spec* ATCC 21808. **5th European Congress in Biotechnology**, July 8-13, Copenhagen, Denmark, 1990.

27. LANG, S.; KATSIWELA, E.; KLEPPE, F.; WAGNER, F. *Ustilago maidis* lipolytic enzymes: Characterization and partial purification. In Alberghina, L.; Schmid, R.D.; Verger, R. (Eds.). **Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering**, GBF Momographs, v.16, Braunschweig, Germany, p.361-364,1991.

28. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 256-275, 1959.

29. MACÊDO, G.A. Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico. Campinas, 1997 a. 143p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
30. MACÊDO, G.A.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp.* **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 90-95, Abr/Jun, 1997 b.
31. MALDONADO, R.R.; BURKERT, J.F.M.; RODRIGUES, M.I. Produção de Lipase por *Penicillium restrictum*, **IX Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, Setembro, Campinas, SP, 2001.
32. MALDONADO, R.R.; BURKERT, RODRIGUES, M.I. Otimização da Produção de Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y 552, **X Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, Setembro, Campinas, SP, 2002
33. MEDEIROS, J.F. Estudo do meio de cultura para produção de lipase por *Geotrichum sp.* Campinas, 1999. 109 p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
34. MENDES, G. L. **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* em processo de batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados.** Campinas, 2006. 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.
35. MENDIETA, O.W; **Purificação de lipase por cromatografia de interação hidrofóbica.** Campinas, 1999. 152 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

36. MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A.A.; PIMENTEL, M.C.B.; LIMA FILHO, J.L.; MELO, E.H.M.; DURÁN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Tecnology**, v.69, p.145-147, 1999.

37. ODA, M.; KAIEBA, M.; HAMA, S.; YAMAJI, H.; KONDO, A.; IZUMOTO, E.; FUKUDA, H. Facilitatory effect of immobilized lipase producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, pg. 45-51, Mar, 2005.

38. PHILIPS, A.; PRETORIUS, G.H.J. Purification and characterization an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. **Biotechnology Letters**, London, v.13, n.11, p.833-838, Nov, 1991.

39. RUA, M.L.; BALLESTEROS, A. Rapid purification of two lipase isoenzymes from *Candida rugosa*. **Biotechnology Techniques**, v.8, n.1, p. 21-26, 1994.

40. RUA, M.L.; SCHIMDT-DANNERT, C.; WAHL, S.; SPRAUER, A.; SCMID, R.D. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behavior and its effect on activity. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 89-102, 1997.

41. SAXENA, R.K.; DAVIDSON, W.S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n.2, p. 239-247, Oct, 2003.

42. SCHMIDHALTER, D.R.; CANEVASCINI, G. Characterization of the cellulolytic enzyme system from the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.37, n.4, p.431-436, Jul, 1992.

43. SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, pg. 141-148, 2004.
44. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long chain fatty acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.74, p.77-80, 1992.
45. SHINONAGA, M.A.; KAWAMURA, Y.; SHIMBO, K.; YAMANE, T. Continuous production of phospholipase D by *Streptomyces lydicus* D-121 immobilized with cross linked chitosan beads. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.81, n.4, p.310-314, Jan, 1996
46. SIEDENBERG, D.; GERLACH, S.R.; WEIGEL, B.; SCHUGERL, K.; GIUSEPPIN, M.L.F.; HUNIK, J. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in stirred tank and airlift tower loop reactors: The influence of stirrer speed and phosphate concentration. **Journal of Biotechnology**, v.56, n.2, p.103-114, Aug, 1997.
47. SOUSA, R.N. **Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações de lipase de *Alcaligenes sp.*** Campinas, 1996. 132p Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
48. SZTAJER, H.; LUNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMID, R. Purification and properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1124, n.3, p.253-261, Mar, 1992.
49. TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, London, v. 39, n. 11, p. 1495-1502, Jul, 2004.

50. TREICHEL, H. **Estudo da produção e purificação da inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL 7571 utilizando meios industriais.** Tese de Doutorado, FEA, UNICAMP, 2004.

51. VANOT, G.; DEYRIS, V.; CUILHEM, M.C.; LUU, R.P.T.; COMEAY, L.C. Optimal design for the maximization of *Penicillium cyclopium* lipase production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 342-345, 2001.

52. VANOT, G.; VALÉRIE, D.; GUILHEM, M.C.; LUU; R.P.T.; COMEAU, L. C. Maximizing production of *Penicillium cyclopium* partial acyglycerol lipase. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.60, p. 417-419, 2002.

53. VEERARAGAVAN, K; COLPITTS, T.; GIBBS, B. Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. **Biochimica and Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1044, n.1, p.26-33, May, 1990.

54. VULFSON, E.N. Enzymatica synthesis of food ingredients in low-water media. **Trends in Food Science & Technology**, New York, v.7, n.5, p.225-229, May, 1985.

55. WASE, D.J.; RAYMAHASAY, S.; WANG, C.W. Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. **Enzyme Microbiology Technology**, New York, v.7, n.5, p.225-229, May, 1985

56. WHITAKER, A.; LONG, P.A. Fungal Pelleting. **Process Biochemistry**, v. 8, p. 27-31, Nov, 1973.

57. YIN, P.; NISHINA, N.; KOSAKAI, Y.; YAHIRO, K.; PARK, Y.; OKABE, M. Enhanced production of L(+) – lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an airlift bioreactor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.84, n.3, p.249-253, Jun, 1997.

