

Artigo Técnico

Estudo da produção de lipase por *Burkholderia cepacia*

Study of lipase production by Burkholderia cepacia

Gabriel Luis Castiglioni^{1*}, Jorge Alberto Vieira Costa², Ranulfo Monte Alegre³

RESUMO

O uso de enzimas pelas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos com eficiência similar aos realizados pela natureza, o que faz dessa tecnologia um dos campos mais promissores na síntese de compostos de alto valor agregado. O presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de lipase por *Burkholderia cepacia* utilizando a metodologia de superfície de resposta. Foram utilizadas as variáveis concentrações de fonte de potássio, magnésio, óleo de soja, água de maceração de milho e pH. Foi observado que, dentro das concentrações utilizadas, o potássio, a água de maceração de milho e o óleo de soja influenciaram positivamente na produção de lipase. O Bioflo III se destacou dentre os biorreatores empregados para a produção da enzima, possivelmente devido a melhor distribuição dos fenômenos de transferência de massa e movimento, alcançando valores de até 2,43 U mL⁻¹ em 120 horas de fermentação.

Palavras-chave: melhora produtiva; resíduos; superfície de resposta.

ABSTRACT

The use of enzymes on an industrial scale has enabled the development of technological processes with an efficiency similar to those made by nature, which makes this technology one of the most promising fields in new technologies for synthesis of high-added value compounds. This paper aimed to study the production of lipase by *Burkholderia cepacia* using the response surface methodology. We used the following variables: concentrations of potassium, magnesium, soybean oil, corn steep liquor and pH. We observed that, among the used concentrations, potassium, corn steep liquor and soybean oil positively influenced the lipase production. Bioflo III showed the best performance among the bioreactors used for the enzyme production, possibly due to a better distribution of mass and movement transfer phenomena, reaching values of up to 2.43 U mL⁻¹ at 120 hours of fermentation.

Keywords: productive improvement; residues; response surface.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado rápido desenvolvimento na área da Biotecnologia, com o aparecimento de novos processos no âmbito industrial envolvendo a utilização micro-organismos e enzimas. Embora a utilização de enzimas esteja aumentando rapidamente, ainda existe grande campo para expansão. Novas substâncias vão criando oportunidades e, em alguns ramos, sua utilização está apenas começando, como é o caso do uso em síntese orgânica (HEUX *et al.*, 2015). Dentre os setores de maior aplicação dos processos biotecnológicos, destacam-se o alimentício, o químico, o farmacêutico, o energético e o ambiental (SCHUMACHER & THUM, 2013).

A biotecnologia da produção de enzimas parte de duas fontes: uma formada por tecidos animais e vegetais, dos quais as substâncias podem ser extraídas, purificadas e, posteriormente, utilizadas; a outra

é composta por aquelas obtidas a partir da extração de meios de cultivo microbiológicos desenvolvidos por técnicas fermentativas (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

O grande interesse na aplicação de enzimas em processos de biocatálise é devido à sua capacidade de atuar de forma seletiva em várias reações (TSAI, 2014). A biocatálise pode ser importante substituto de muitos processos puramente químicos, sendo, por isso, um ramo conhecido como “química verde” (SHARMA *et al.*, 2008).

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são responsáveis pela catálise de reações que envolvem hidrólise e síntese de éster a partir de glicerol e ácidos graxos de cadeias longas, fazendo com que sejam consideradas como um importante grupo de biocatalisadores (JOCHENS *et al.*, 2011). A sua atuação se dá na interface óleo-água, o que as confere potencial de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico.

¹Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO), Brasil.

²Universidade Federal do Rio Grande – Rio Grande (RS), Brasil.

³Universidade Estadual de Campinas – Campinas (SP), Brasil.

*Autor correspondente: g_castigli@yahoo.com.br

Recebido: 20/10/2015 – Aceito: 30/03/2017 – Reg. ABES: 155612

O potencial biotecnológico das lipases está relacionado à sua alta estabilidade em solventes orgânicos, à ausência de cofatores, à ampla especificidade pelo substrato e à alta enantiosseletividade (TSAI, 2014).

As lipases bacterianas extracelulares são encontradas em vários gêneros, tais como *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Burkholderia* (LIEW *et al.*, 2015). As lipases oriundas de *Burkholderia* possuem como características: boa estabilidade a alta alcalinidade; estabilidade térmica; tolerância a solventes orgânicos; enantiosseletividade; atividade enzimática em diferentes pH; e não toxicidade ao ambiente (LAU *et al.*, 2011). Outras vantagens são sua boa atividade catalítica em diferentes substratos bem como sua solubilidade parcial (SHOW *et al.*, 2013). Devido às propriedades biodegradáveis e não tóxicas, as lipases podem ser produzidas com menos matéria-prima e menos geração de resíduos do que outros processos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Dentre suas aplicações, está o uso em: alimentos (KHEADR; VUILLEMARD; EL-DEEB, 2003), detergentes (KUMAR; MALIK; TIWARI, 1998), produtos farmacêuticos (BONRATH; KARGE; NETSCHER, 2002), papel (HOU; SHIMADA 2009), cosméticos (AZIM *et al.*, 2001), indústrias de pesticidas (XU *et al.* 2009), biomédica (LINARES & BALDESSARI 2013), em biossensores (BAALI *et al.*, 2013) e proteção ambiental (JORDAN & MULLEN, 2007).

A lipase de *Burkholderia cepacia* é uma enzima extracelular que pode ser amplamente utilizada para o controle biológico de doenças em plantas e a biodegradação de poluentes ambientais. Essa enzima possui alta seletividade, estabilidade e tolerância ao álcool. É frequentemente usada como biocatalisador em várias biotransformações (LI *et al.*, 2013; HU *et al.*, 2012).

Tendo em vista as observações anteriormente mencionadas, o presente trabalho teve por objetivo estudar a produção de lipase produzida por *Burkholderia cepacia* em diferentes condições de cultivo.

METODOLOGIA

Micro-organismo, manutenção e estudo das condições nutricionais

A cepa ATCC 25416 de *Burkholderia cepacia* foi obtida da Fundação André Tosello e mantida em tubo de ensaio com ágar nutriente, com pH 6,5 a 4°C.

Antes que as fermentações fossem conduzidas, o micro-organismo foi previamente adaptado em frascos do tipo erlenmeyer de 125 mL, com 60 mL de meio composto de extrato de levedura (2 g L⁻¹), peptona (5 g L⁻¹) e 3% (v/v) de óleo de soja, durante 72 horas, a 30°C e 150 rpm (BUENO *et al.*, 2014).

Após a etapa de adaptação, 10 mL do inóculo foram transferidos para erlenmeyers de 125 mL contendo 60 mL de meio, cuja composição variou de acordo com a construção de 3 delineamentos experimentais. No primeiro, foi proposto um delineamento fatorial fracionário 2⁴⁻¹ (Delineamento 1), com as seguintes variáveis: pH, concentrações de KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e óleo de soja (Tabela 1).

Os demais experimentos foram conduzidos a partir de dois delineamentos experimentais fatoriais completos 2³, com triplicata no ponto central. O Delineamento 2 utiliza as concentrações de água de maceração de milho (AMM), KH₂PO₄ e MgSO₄.7H₂O como variáveis (Tabela 2); já o Delineamento 3, as concentrações de KH₂PO₄, MgSO₄.7H₂O e óleo de soja (Tabela 3).

A AMM utilizada nos experimentos foi uma solução concentrada MILHOCINA[®], da empresa Corn Productis Brasil, obtida a partir da maceração de grãos de milho, contendo em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos, vitaminas e sais minerais. As fermentações foram conduzidas a 30°C e 150 rpm em *shaker* Marconi MA 830 durante 96 horas.

Tabela 1 - Níveis de variação utilizados no planejamento experimental fracionário 2⁴⁻¹ com triplicata no ponto central para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
KH ₂ PO ₄	2g/L	3g/L	4g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g/L	0,15g/L	0,2g/L
Óleo de soja	5%	7,50%	10%
pH	7,00	7,25	7,50

Tabela 2 - Níveis de variação utilizados no primeiro delineamento experimental fatorial 2³ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
AMM (mL _{v/v})	0,55	1,38	2,75
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	3,00	4,00	5,00
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,10	0,20	0,30

Tabela 3 - Níveis de variação utilizados no segundo delineamento experimental fatorial 2³ com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase por *Burkholderia cepacia*.

Variável	Níveis		
	-1	0	1
Óleo de soja (mL _{v/v})	1,65	1,38	3,85
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	3,00	4,00	5,00
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,10	0,20	0,30

Estudo da produção de lipase em diferentes biorreatores

O meio de cultivo base utilizado para este estudo foi mesmo proposto por Bueno *et al.* (2014): extrato de levedura (2 g L^{-1}), peptona (5 g L^{-1}), KH_2PO_4 ($3,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,2 \text{ g L}^{-1}$) e 5% (v/v) de óleo de soja.

Os reatores utilizados para avaliar o efeito na produção de lipase de *Burkholderia cepacia* foram: erlenmeyers de 250 mL com volume útil de 150 mL, sem aeração; erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 150 mL, agitados em *shaker* a 150 rpm; erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de 150 mL, com fornecimento de ar; LSL biolafitte SA com volume útil de 1.000 mL e sistema de agitação de rosca helicoidal; New Brunswick Scientific Bioflo III, com volume útil de 1.000 mL e sistema de agitação com turbina de Rushton com 6 palas planas.

Nos reatores aerados, o fornecimento de ar foi mantido a partir do uso de bombas de diafragma, adaptadas a filtros revestidos com lã de vidro e rotâmetros para controle de vazão em 1 vvm.

Portanto, diferentes biorreatores foram estudados para possibilitar uma diversidade de sistemas de transferência dos fenômenos de movimento, energia e massa no volume de controle compreendendo o meio de cultivo e, assim, avaliar a produção da lipase nessas condições.

Extração e atividade da lipase

O meio da fermentação foi centrifugado a 1.372 g unit, durante 15 minutos, visando à obtenção de lipase extracelular. O extrato enzimático utilizado para Análise de Atividade Lipolítica foi o sobrenadante proveniente da extração da lipase. Tal procedimento foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita por Macêdo, Park e Pastore (1997), adequada após algumas modificações.

A mistura reacional é composta por 5 mL de emulsão de óleo de oliva e por solução de goma arábica 7% (proporção de 25:75, respectivamente), além de 2 mL de tampão fosfato 10 mM pH 8,0 e de 1 mL de extrato enzimático, mantida sob agitação em *shaker* a 150 rpm e a 37°C durante 30 minutos.

Os ácidos graxos presentes na emulsão no tempo 0 min (branco) e os liberados durante a reação foram titulados com solução de NaOH 0,05 N. Além disso, uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar $1 \mu\text{mol}$ de ácido graxo por minuto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de a produção de lipase não ter apresentado efeitos significativos, verificou-se que o aumento da concentração de óleo de soja e da fonte de potássio influenciou positivamente na produção da enzima;

porém o efeito contrário foi verificado para a fonte de magnésio e para pHs mais elevados. Os resultados podem ser observados nas superfícies de respostas da Figura 1.

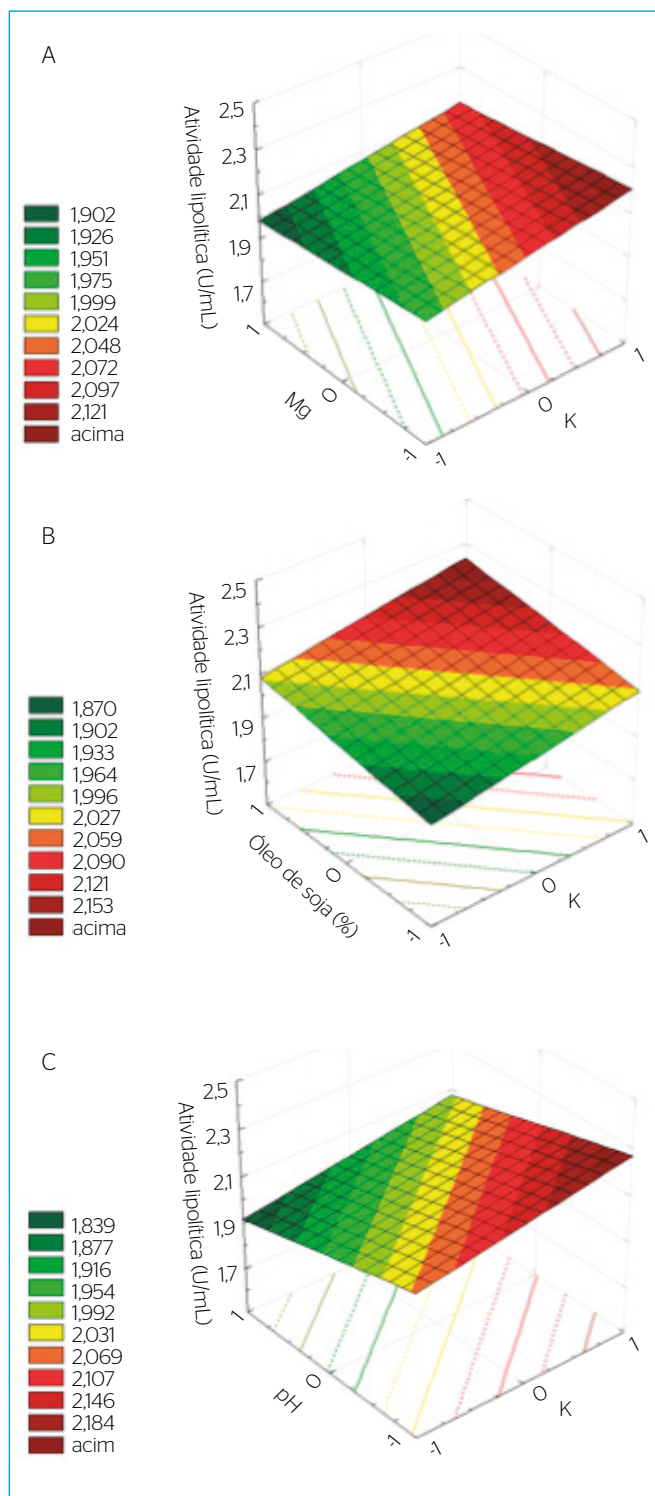


Figura 1 - Superfícies de resposta para a produção de lipase por *Burkholderia cepacia* utilizando planejamento experimental fracionário 24-1 com triplicata no ponto central. Atividade lipolítica em função da concentração de Mg e K (A), concentração de óleo de soja e K (B) e pH e concentração de K (C).

Na Figura 1, verifica-se diminuição da produção de lipase no meio fermentativo quando a concentração de magnésio no meio de cultivo é mais elevado. Essa observação mostra que, apesar de esse nutriente ser um cofator enzimático essencial para o funcionamento dos micro-organismos, pode atuar negativamente no seu desenvolvimento.

Nesse sentido, alguns autores mencionam que, quando em excesso, essa substância provoca interferências na absorção de cálcio e potássio, além de atuar na estabilização de ribossomas e membranas (AIRAWA, 1981). Tais observações podem ser associadas aos resultados encontrados.

Vários são os estudos envolvendo a utilização de diferentes substratos na produção de lipase, e sua adição ao meio de crescimento é considerada como essencial para fermentação (KANMANI; KUMARESAN; ARAVIND, 2015; NEETHU *et al.*, 2015).

Os resultados referentes à fonte de potássio mostram incremento da produção da lipase quando aumentada a sua concentração no meio de cultivo. Isso pode ser explicado pelo fato de o potássio atuar como regulador osmótico necessário à atividade enzimática e à síntese proteica.

O potássio e o magnésio são compostos de grande importância para o metabolismo de micro-organismos, pois, dependendo de sua concentração, podem atuar favorecendo ou inibindo determinadas rotas metabólicas. Suas concentrações, embora em quantidades muito menores que o carbono e o nitrogênio, são requeridas a níveis significativos pelos micro-organismos, quando comparados aos demais nutrientes.

O acréscimo na demanda de energia exige que os níveis de magnésio estejam adequados, pois a produção de adenosina trifosfato (ATP), a partir de carboidratos, lipídeos e proteínas, não é concretizada na falta desse nutriente. Considerando que grande parte da energia provém da hidrólise de ATP, uma baixa concentração de magnésio pode resultar em diminuição do rendimento fermentativo, devido à diminuição da produção de energia (AIRAWA, 1981).

Tabela 4 – Efeitos encontrados nos Delineamentos 1 e 2 para a produção de lipase de *Burkholderia cepacia*.

Delineamento 1			Delineamento 2		
Variáveis	Efeito	p	Variáveis	Efeito	p
(1) AMM	0,886*	0,063	(1) OS	0,081	0,626
(2) K	0,564	0,179	(2) K	0,886*	0,004
(3) Mg	0,080	0,828	(3) Mg	-0,403*	0,058
1 com 2	0,886*	0,063	1 com 2	0,242	0,189
1 com 3	-0,242	0,524	1 com 3	-0,081	0,626
2 com 3	-0,242	0,524	2 com 3	-0,242	0,189

(1): Experimentos com água de maceração de milho (AMM); (2): Experimentos com peptona e extrato de levedura; OS: Óleo de soja; K: KH_2PO_4 ; Mg: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; *Efeitos significativos.

Na Tabela 4 são mostrados os efeitos encontrados para os delineamentos experimentais fatoriais completos ²³.

A partir dos resultados encontrados, observa-se aumento significativo da atividade da lipase. Além disso, a concentração de AMM, quando adicionada ao meio de cultivo, apresentou efeito positivo de 0,886 vezes na resposta ao passar do nível inferior para o superior. Esse mesmo valor foi encontrado para a sua interação com KH_2PO_4 .

Comparando o segundo e o terceiro delineamento experimental, observa-se que o uso de AMM propiciou o aumento significativo na produção de lipase, alcançando resultados de aproximadamente $2,9 \text{ U mL}^{-1}$. Tais valores mostram o potencial de utilização desse subproduto na redução dos custos de obtenção de lipase por *Burkholderia cepacia*. Esse aumento na produção provavelmente se deu pelo fato de a AMM ser excelente fonte de nutrientes, apresentando em sua composição química os principais aminoácidos e nutrientes necessários para o desenvolvimento e o metabolismo de vários micro-organismos.

O uso de subprodutos da indústria de alimentos tem sido uma oportunidade de substratos de baixo custo para a produção de diferentes biocompostos. Dessa forma, a AMM (por ser um concentrado obtido da água de maceração de grãos de milho, contendo em sua composição química carboidratos solúveis, aminoácidos, sais minerais e vitaminas) acaba sendo uma promissora fonte de nutrientes em processos fermentativos.

As lipases apresentam limitações do uso industrial devido ao seu alto custo (RIGO *et al.*, 2010). Por isso, a aplicação de subprodutos agroindustriais em bioprocessos se torna interessante, pois, além da possibilidade de formular outros meios, também ajuda na resolução de problemas de poluição (GRAMINHA *et al.*, 2008).

A análise dos resultados mostra que a concentração de AMM e sua interação com concentração de KH_2PO_4 foram significativas no nível de confiança de 90%, com coeficiente de correlação 0,807. Já para os experimentos utilizando peptona e extrato de levedura, as variáveis que apresentaram efeitos significativos (coeficiente de correlação de 0,920) foram as concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Nos experimentos em que a AMM foi substituída por concentrações fixas de peptona e extrato de levedura e a concentração de óleo de soja oscilou, as variáveis significativas foram as concentrações de KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, apresentando efeito positivo de 0,886 vezes e negativo de 0,403 vezes, respectivamente. Esses resultados podem ser visualizados nas superfícies de resposta das Figuras 2 e 3.

Outra observação do presente trabalho é o leve acréscimo da produção de lipase com o aumento da concentração de óleo de soja no meio de cultivo. Os substratos lipídicos participam da síntese de lipases atuando como indutores, como é o caso do óleo de soja (RIGO *et al.*, 2010; AZEREDO *et al.*, 2007).

O micro-organismo pode utilizar esse substrato de modo sequencial, de modo que, inicialmente, o óleo é hidrolisado pelas lipases presentes no inóculo. Em seguida, o micro-organismo consome o glicerol e, posteriormente, os ácidos graxos

com a consequente indução da produção significativa de lipase (MONTESINOS *et al.*, 1996).

Algumas fontes de carbono, além de apresentar vantagens no que diz respeito ao aumento da produção de lipase, sugerem a possibilidade

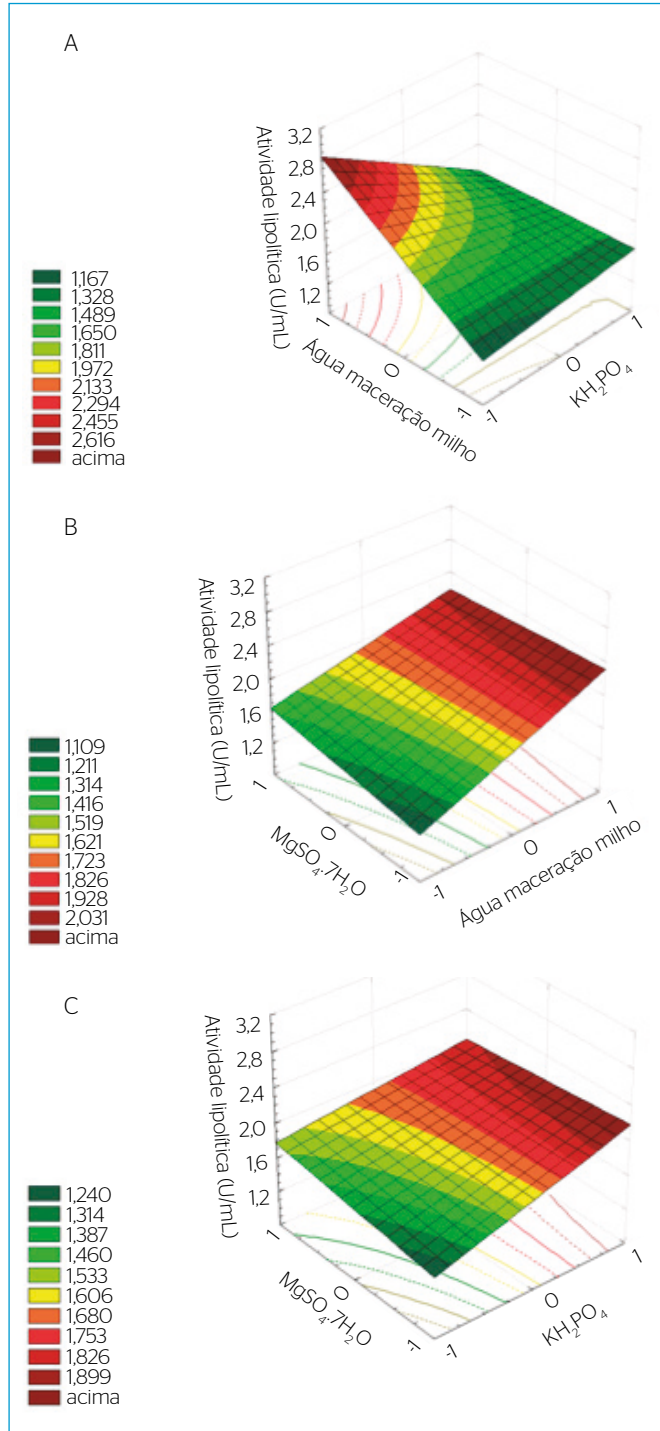


Figura 2 - Superfícies de resposta do delineamento experimental fatorial 23 com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando água de maceração de milho no meio de cultivo. Atividade lipolítica em função da concentração de água de maceração de milho e KH_2PO_4 (A), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e água de maceração de milho (B) e KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C).

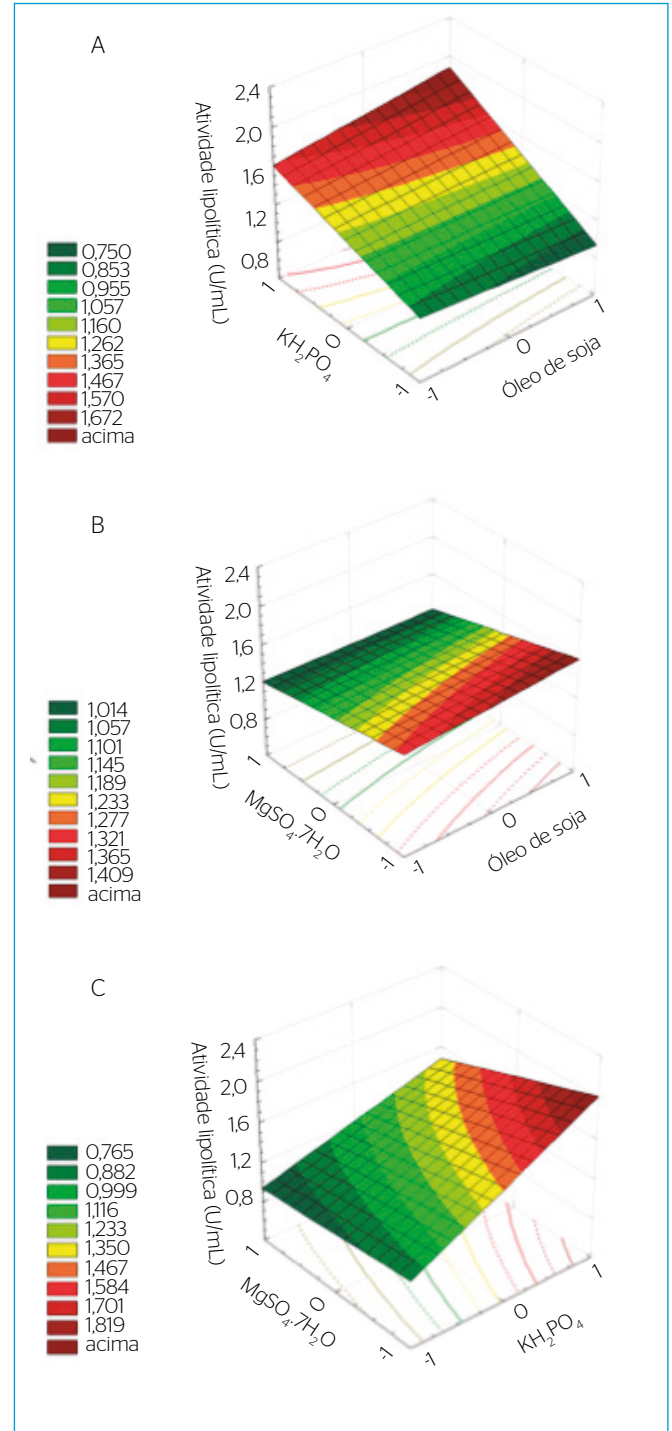


Figura 3 - Superfícies de resposta do delineamento experimental fatorial 23 com triplicata no ponto central para os experimentos de produção de lipase de *Burkholderia cepacia* utilizando pepton e extrato de levedura no meio de cultivo. Atividade lipolítica em função da concentração de KH_2PO_4 e óleo de soja (A), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e óleo de soja (B) e KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (C).

de utilizar produtos oleosos de baixo valor agregado, reduzindo, conseqüentemente, o custo final de produção da enzima.

Messias *et al.* (2009) estudaram a influência de diferentes óleos vegetais e glicerol na produção de lipase por *Botryosphaeria*. Tais valores foram reportados tendo em conta a quantidade de proteína presente, visto que apenas uma parte compreende a parcela referente à lipase. Esses resultados foram de até $17,6 \text{ U mg}^{-1}_{\text{proteína}}$ nos primeiros experimentos. Maldonado *et al.* (2014), em seu trabalho de produção de lipase por *Geotrichum sp* a 30°C e 250 rpm, chegaram a encontrar valores entre 2 e 16 U mL^{-1} utilizando meio de cultivo com peptona 5.0%_{p/v}, NaNO_3 0.1%_{p/v}, MgSO_4 0.1%_{p/v} e óleo de soja 1.0%_{p/v}.

Outro fator importante nos processos de fermentação é o tipo de reator, visto que sua influência na transferência de movimento, calor e massa é extremamente significativa. Grande parte dos estudos relacionados a esse assunto mostra a influência da geometria no fornecimento do oxigênio, indispensável à atividade microbiana (MERCHUK & SIEGEL, 1988).

Dependendo do biorreator, a mistura do meio de cultivo pode não ser eficiente, a menos que o fluxo no recipiente seja turbulento. Todos os fatores que influenciam a mistura podem ser descritos como a combinação de três processos físicos: a distribuição, a dispersão e a difusão.

Normalmente, quando se injeta ar nos processos de fermentação, pode-se diminuir, ou até eliminar, o uso da agitação. As bolhas causam a diminuição da densidade aparente do fluido, bem como o aumento da sua agitação. No presente trabalho nota-se que somente o fornecimento de ar não foi suficiente para alcançar resultados tão bons, quando comparado ao emprego conjunto do sistema de aeração com agitação de turbina.

Os perfis de atividade lipolítica nos diferentes reatores (Figura 4) mostram que a aeração associada à agitação do meio de cultivo influi de forma significativa na produção de lipase.

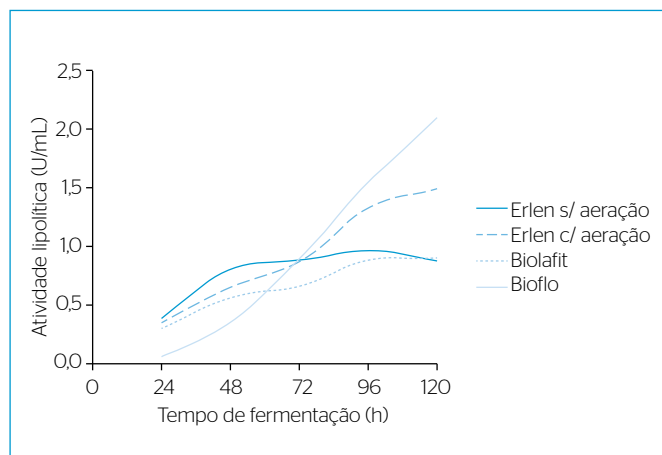


Figura 4 - Perfil de produção de lipase utilizando diferentes biorreatores.

O sistema de agitação de turbinas, com seis palas planas (turbina Rushton) e aeração distribuída por pequenos orifícios na parte inferior do reator tipo Bioflo, apresentou o melhor desempenho na produção de lipase. Possivelmente a turbina promoveu a quebra e a distribuição mais efetiva das bolhas de ar no meio de fermentação. Ao se aerar o meio agitado mecanicamente, neste caso pelo uso da turbina de Rushton, ocorre a diminuição do diâmetro das bolhas e observa-se redução da potência dissipada devido à redução da densidade aparente da mistura líquido/bolhas ao redor da turbina.

Bons resultados também foram encontrados nos reatores do tipo erlenmeyer com aeração. Já para o reator Biolafit, apesar de dispor de sistema de agitação com rosca helicoidal e aeração na parte inferior do reator, não foi eficiente no processo de produção de lipase. Esses resultados podem ser explicados pela possível diminuição do tempo de residência do ar no meio de fermentação, afetando a absorção do oxigênio pelo micro-organismo. Os reatores do tipo erlenmeyer sem aeração também não apresentaram bons resultados devido à pequena área superficial, responsável pela incorporação do ar no meio de fermentação.

Os resultados encontrados demonstram que, possivelmente, o O_2 é limitante para a produção de lipase. Nesse sentido, é essencial o conhecimento sobre a influência da agitação e da aeração, pois elas podem influenciar nas características de crescimento e fisiológicas dos micro-organismos, além de auxiliar na escolha do sistema mais adequado (VALENCIA *et al.*, 2014). A agitação pode afetar positivamente o andamento do processo, por favorecer a transferência dos nutrientes do meio para as células, influenciando diretamente no andamento do processo (TIAN *et al.*, 2015).

Outro aspecto relevante é a geometria dos reatores nos processos fermentativos, pois essa variável afeta significativamente o fornecimento de oxigênio à atividade microbiana (HABERMACHER *et al.*, 2015).

Portanto, a escolha de tipo de reator também é importante devido à eficiente distribuição de gases, aumentando seu tempo de residência no meio e resultando, conseqüentemente, na diminuição significativa dos custos operacionais (ARJUNWADKAR *et al.*, 1998).

CONCLUSÃO

A produção de lipase por *Burkholderia cepacia* foi influenciada positivamente quando foram acrescidos ao meio de fermentação os seguintes nutrientes: fonte de potássio, óleo de soja e água de maceração de milho. Dessa forma, a atividade lipolítica pode alcançar, aproximadamente, $2,9 \text{ U mL}^{-1}$. Entretanto, a adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ influenciou negativamente na produção de lipase. Por fim, o fermentador tipo Bioflo III foi o mais eficiente dentre os modelos avaliados: apresentou atividade lipolítica de $2,43 \text{ U mL}^{-1}$ em 120 horas de fermentação.

REFERÊNCIAS

- AIRAWA, J.R. (1981) *Magnesium: its biological significance*. Boca Raton: CRC Press.
- ARJUNWADKAR, S.J.; SARVANAN, K.; KULKARNI, P.R.; PANDIT, A.B. (1998) Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 1, p. 99-106. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(97\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(97)00083-1)
- AZEREDO, L.A.I.; GOMES, P.M.; SANT'ANNA JR., G.L.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. (2007) Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentations. *Current Microbiology*, v. 54, p. 361-365. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0425-7>
- AZIM, A.; SHARMA, S.K.; OLSEN, C.E.; PARMAR, V.S. (2001) Lipase catalysed synthesis of optically enriched α -haloamides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 1345-1348. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00006-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00006-2)
- BAALI, S.; KHERRAT, R.; ZOUGAR, S.; DJEGHABA, Z.; BENAMIA, F.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; HADDOUR, N. (2013) Comparative study of responses of two enzymatic biosensors based on lipase from *Candida rugosa* and Porcine pancreas for detection of diclofop-methyl. *Sensor letters*, v. 11, p. 2021-2029. <http://dx.doi.org/10.1166/sl.2013.3058>
- BONRATH, W.; KARGE, R.; NETSCHER, T. (2002) Lipase-catalyzed transformations as key-steps in the large-scale preparation of vitamins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, p. 67-72. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00152-2](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00152-2)
- BUENO, P.R.M.; OLIVEIRA, T.F.; CALIARI, M.; CASTIGLIONI, G.L.; SOARES JÚNIOR, M.S. (2014) Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. *African Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 566-573. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2013.13453>
- GRAMINHA, E.B.N.; GONCALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. (2008) Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, v. 144, p. 1-22. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.029>
- HABERMACHER, J.; BENETTI, A.D.; DERLON, N.; MORGENROTH, E. (2015) The effect of different aeration conditions in activated sludge e Side-stream system on sludge production, sludge degradation rates, active biomass and extracellular polymeric substances. *Water Research*, v. 85, p. 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.08.002>
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. (2006) Industrial application of microbial lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235-251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- HEUX, S.; MEYNIAL-SALLES, I.; O'DONOHUE, M.J.; DUMON, C. (2015) White biotechnology: State of the art strategies for the development of biocatalysts for biorefining. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1653-1670. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.004>
- HOU, C.T.; SHIMADA, Y. (2009) *Lipases, Industrial Uses*. Oxford: Elsevier.
- HU, Y.; TANG, S.S.; JIANG, L.; ZOU, B.; YANG, J.; HUANG, H. (2012) Immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase on functionalized ionic liquids modified mesoporous silica SBA-15. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2291-2299. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.09.007>
- JOCHENS, H.; HESSELER, M.; STIBA, K.; PADHI, S.K.; KAZLAUSKAS, R.J.; BORNSCHEUER, U.T. (2011) Protein engineering of alpha/beta-hydrolase fold enzymes. *ChemBioChem*, v. 12, p. 1508-1517. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000771>
- JORDAN, S.N.; MULLEN, G.J. (2007) Enzymatic hydrolysis of organic waste materials in a solid-liquid system. *Waste Management*, v. 27, p. 1820-1828. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2006.12.020>
- KANMANI, P.; KUMARESAN, K.; ARAVIND, J. (2015) Utilization of coconut oil mill waste as a substrate for optimized lipase production, oil biodegradation and enzyme purification studies in *Staphylococcus pasteurii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 18, p. 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.11.003>
- KHEADR, E.E.; VUILLEMARD, J.C.; EL-DEEB, S.A. (2003) Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening. *Food Research International*, v. 36, p. 241-252. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00166-7](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00166-7)
- KUMAR, C.G.; MALIK, R.; TIWARI, M. (1998) Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Current Science*, v. 75, p. 1312-1318.
- LAU, H.; ARIFF, A.; WOO, K.K.; LING, T.C.; HII, S.L. (2011) Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, p. 7002-7009. <https://doi.org/10.5897/AJB11.213>
- LIEW, Y.X.; CHAN, Y.J.; SHOW, P.L.; MANICKAM, S.; CHONG, M.F. (2015) Optimization of alkaline lipase production from *Burkholderia cepacia* through submerged fermentation. *Chemical Engineering Transactions*, v. 45, p. 1675-1680. <https://doi.org/10.33031/CET1545280>
- LI, X.; HUANG, S.; XU, L.; YAN, Y. (2013) Improving activity and enantioselectivity of lipase via immobilization on macroporous resin for resolution of racemic 1- phenylethanol in non-aqueous medium. *BMC Biotechnology*, v. 13, p. 986-991. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-92>
- LINARES, G.G.; BALDESSARI, A. (2013) Lipases as efficient catalysts in the synthesis of monomers and polymers with biomedical applications. *Current Organic Chemistry*, v. 17, p. 719-743. <https://doi.org/10.2174/1385272811317070007>
- MACÊDO, G.A.; PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. (1997) Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum* sp. *Journal of the Brazilian Society for Microbiology*, v. 28, p. 90-95.

- MALDONADO, R.R.; BURKERT, J.F.M.; OLIVEIRA, E.A.; DURRANT, L.; MAZUTTI, M.A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M.I. (2014) Elucidation of the effects of inoculum size and age on lipase production by *Geotrichum candidum*. *Biotecnologia Aplicada*, v. 31, p. 216-221.
- MERCHUK, J.C.; SIEGEL, M.H. (1988) Air-lift reactors in chemical and biological technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 41, p. 105-120. <https://doi.org/10.1002/jctb.280410204>
- MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. (2009) Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 426-431. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.08.013>
- MONTESINOS, J.L.; OBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. (1996) Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 59, p. 25-37. <https://doi.org/10.1007/BF02787855>
- NEETHU, C.S.; RAHIMAN, K.M.M.; ROSMINE, E.; SARAMMA, A.V.; HATHA, A.A.M. (2015) Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 4, n. 4, p. 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.002>
- RIGO, E.; NINOW, J.L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J.V.; POLLONI, A.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. (2010) Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *LWT - Food Science and Technology*, v. 43, n. 7, p. 1132-1137. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.002>
- SCHUMACHER, M.B.A.; THUM, O. (2013) Immobilised lipases in the cosmetics industry. *Chemical Society Reviews*, v. 42, p. 6475-6490. <https://doi.org/10.1039/C3CS35484A>
- SHARMA, P.; HARANATH, D.; CHANDER, H.; SINGH, S. (2008) Green chemistry approach for the synthesis of intense green light emitting long persistent phosphor in nanoscale. *Applied Surface Science*, v. 254, p. 4052-4055. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.12.040>
- SHOW, P.L.; WEI, O.C.; ANUAR, M.S.; ARIFF, A.; YUSOF, Y.A.; CHEN, S.K.; ANNUAR, M.S.M.; LING, T.C. (2013) Recovery of lipase derived from *Burkholderia cenocepacia* ST8 using sustainable aqueous two-phase flotation composed of recycling hydrophilic organic solvent and inorganic salt. *Separation and Purification Technology*, v. 110, p. 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.03.018>
- TIAN, L.L.; ZOU, D.; YUAN, H.; WANG, L.; ZHANG, X.; LI, X. (2015) Identifying proper agitation interval to prevent floating layers formation of corn stover and improve biogas production in anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, v. 186, p. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.018>
- TSAI, S.W. (2014) Enantiopreference of *Candida antarctica* lipase B toward carboxylic acids: Substrate models and enantioselectivity thereof. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 127, p. 98-116. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.07.010>
- VALENCIA, R.T.; CRUZ, C.G.; GALINDO, E.; CARREÓN, L.S. (2014) Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology*, v. 177, p. 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.013>
- XU, J.H.; ZHOU, R.; BORNSCHEUER, U.T. (2009) Comparison of differently modified *Pseudomonas cepacia* lipases in enantioselective preparation of a chiral alcohol for agrochemical use. *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 23, p. 415-422. <https://doi.org/10.1080/10242420500387342>