

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES DE
Staphylococcus warneri EX17 PRODUZIDAS EM GLICEROL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFRGS como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutora em Engenharia Química.

Giandra Volpato

Engenheiro de Alimentos, MSc.

Orientador: Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio Xandro Heck

Co-orientador no exterior: José Manuel Guisán

Porto Alegre (RS), Brasil

Janeiro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese *Produção, Purificação e Imobilização de Lipases de Staphylococcus warneri EX17 Produzidas em Glicerol*, elaborada por Giandra Volpato, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof^a.Dr^a. Lígia Damasceno F. Marczak

Prof.Dr. Carlos Termignoni

Prof^a.Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Marco Antônio Záchia Ayub e Júlio Xandro Heck, meu sincero agradecimento pela orientação precisa, incentivo, críticas e ensinamentos realizados ao longo deste trabalho.

Aos meus orientadores durante o período no exterior, José Manuel Guisán e Cesar Mateo, pelo grande incentivo, dedicação, generosidade e ensinamentos na parte de purificação e imobilização de enzimas.

À CAPES pelo suporte financeiro durante a etapa no exterior.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, em especial aos seus professores e funcionários.

Ao Patricio, secretário do PPGEQ, pela pronta ajuda sempre quando necessário.

Agradeço aos professores, Dr. Carlos Termignoni, Dr^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert e Dr^a. Lígia Damasceno F. Marczak, por terem aceitado discutir este trabalho, pelas sugestões e correções realizadas.

Aos colegas do BIOTECLAB, a todos que passaram pelo laboratório e aos que ficaram, agradeço pela ajuda, amizade e carinho durante este trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica, Deise, Renata e Letícia, pela grande ajuda, amizade e alegria que pude compartilhar com vocês.

Aos meus colegas do Laboratório de Biocatálise do ICP de Madri, a estas pessoas muito especiais quero agradecer o carinho, amizade e colaboração nesta etapa tão importante do meu trabalho e da minha vida pessoal. Gostaria de agradecer especialmente a Roberto Fernández-Lafuente pela ajuda na elaboração dos artigos e discussões dos experimentos, a Mateo pela grande ajuda em todos os experimentos realizados, a Marco e Glória pelos ensinamentos e auxílio nos testes de hidrólise e enantioseletividade, a Palomo pelas discussões e idéias, a Blanca pela ajuda na identificação do microrganismo e tentativas de clonagem.

Aos amigos Camila, Claucia, Júlio e Leonardo, pela amizade e carinho, agradeço pela oportunidade de dividir minhas angustias e minhas alegrias com pessoas tão especiais.

Gostaria de agradecer a Sheyla e ao Ronaldo por toda ajuda, apoio e incentivo nesta etapa, assim como em muitas outras que passei em minha vida.

À minha família, meus pais Mari e Primo, meus irmãos Gian e Alan, pelo amor, carinho, apoio e incentivo. Agradeço por entenderem a minha ausência, por me ensinarem a importância da dedicação e respeito ao trabalho que se está realizando. Os tenho sempre em meus pensamentos.

Ao Rafael, meu amor, a pessoa que esteve sempre ao meu lado, compartilhando os momentos difíceis, as alegrias, as comemorações e as experiências que fizeram parte deste período. Agradeço pelo incentivo, amor, amizade, carinho e auxílio na realização desta tese, meu enorme reconhecimento e retribuição. À você dedico este trabalho.

SUMÁRIO

INDICE DE FIGURAS _____	vii
INDICE DE TABELAS _____	ix
RESUMO _____	x
ABSTRACT _____	xi
INTRODUÇÃO _____	1
Capítulo I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA _____	4
1.1. Tecnologia enzimática _____	4
1.2. Lipases _____	4
1.3. Produção de lipases _____	7
1.3.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases _____	7
1.3.2. Lipases de <i>Staphylococcus</i> _____	8
1.4. Condições de cultivo para produção de lipases _____	10
1.4.1. Utilização de glicerol como substrato _____	12
1.5. Cultivo submerso _____	14
1.6. Purificação de lipases _____	15
1.7. Imobilização de enzimas _____	16
1.7.1. Estratégias de imobilização de enzimas _____	17
1.7.1.1. Adsorção interfacial sobre suportes hidrofóbicos _____	18
1.7.1.2. Imobilização por união covalente _____	18
1.8. Aplicação de lipases _____	21
1.9. Utilização de ferramentas estatísticas _____	22

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS II, III, IV E V	24
Capítulo II - PRODUCTION OF ORGANIC SOLVENT TOLERANT LIPASE BY <i>Staphylococcus caseolyticus</i> EX17 USING RAW GLYCEROL AS SUBSTRATE	25
Capítulo III - EFFECTS OF OXYGEN VOLUMETRIC MASS TRANSFER COEFFICIENT AND pH ON LIPASE PRODUCTION BY <i>Staphylococcus warneri</i> EX17	48
Capítulo IV - PURIFICATION AND HYPERACTIVATION OF A LIPASE FROM <i>Staphylococcus warneri</i> EX17	67
Capítulo V - MODULATION OF A LIPASE FROM <i>Staphylococcus warneri</i> EX17 USING IMMOBILIZATION TECHNIQUES	83
Capítulo VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
Capítulo VII - PERSPECTIVAS	110
Capítulo VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
Capítulo IX - APÊNDICES	127
Apêndice 1 – RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NOS MANUSCRITOS	127
1. Seleção de microrganismos produtores de lipases	127
Aproveitamento de Glicerol para Produção de Lipase por <i>Bacillus</i> spp. BL74 Isolado de Ambientes Amazônicos	128
2. Seleção e identificação de microrganismos com atividade lipolítica	144
2.1. Identificação do microrganismo	144
2.1.1. Extração do DNA bacteriano	144
2.1.2. Amplificação do DNA mediante PCR	145
2.1.3. Sequenciamento do DNA	145
3. Sequenciamento da lipase de 40 kDa de <i>S. warneri</i> EX17	146

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Reação seqüencial de atuação de lipase sobre triacilglicerol	5
Figura 2 - Ativação interfacial de lipases com interfases hidrofóbicas	6
Figura 3 - Adsorção interfacial de lipases sobre uma superfície hidrofóbica	18
Figura 4 - Imobilização covalente multipontual de enzimas sobre suportes glioxil-agarose	20
CAPÍTULO II	
Figure 1 - Contour plots of lipolytic activity	40
Figure 2 - The time course of lipase production by <i>S. caseolyticus</i> EX17 cultivated under optimized culture conditions with pure glycerol and raw glycerol	42
CAPÍTULO III	
Figure 1 - Influence of pH in the cultivation of <i>S. warneri</i> EX17 under oxygen transfer rate of 38 h ⁻¹ . (a) cell growth and (b) lipase volumetric activity	56
Figure 2 - Cultivation of <i>S. warneri</i> EX17 under oxygen transfer rate of 26 h ⁻¹ , with controlled pH 7.0	57
Figure 3 - Cultivation of <i>S. warneri</i> EX17 under oxygen transfer rate of 38 h ⁻¹ , with controlled pH 7.0	58
Figure 4 - Cultivation of <i>S. warneri</i> EX17 under oxygen transfer rate of 50 h ⁻¹ , with controlled pH 7.0	59
Figure 5 - Cultivation of <i>S. warneri</i> EX17 under oxygen transfer rate of 83 h ⁻¹ , with controlled pH 7.0	60
Figure 6 - Description of <i>S. warneri</i> EX17 lipase production by Luedeking-Piret model	61
CAPÍTULO IV	
Figure 1 - Adsorption courses of SWL on butyl Toyopearl (circles) or octyl-Sepharose supports	74
Figure 2 - Desorption of SWL adsorbed on octyl-Sepharose or butyl-Toyopearl	75
Figure 3 - .SDS-PAGE analysis of the SWL purification	76

Figure 4 - (a) Immobilization course of SWL on CNBr-Sepharose. (b) Inactivation courses at 60 °C in 25 mM sodium phosphate pH 7 of soluble-SWL and CNBr-SWL. _____ 77

Figure 5 - Effect of the presence of detergents in SWL activity _____ 79

CAPÍTULO V

Figure 1 - Stability of soluble SWL at pH 10 under different experimental conditions _____ 92

Figure 2 - Immobilization course of *S. warneri* EX17 on glyoxyl-agarose at pH 10 and 25 °C _____ 93

Figure 3 - Immobilization course of *S. warneri* EX17 on: (a) octyl-agarose; (b) CNBr-agarose _____ 94

Figure 4 - Inactivation courses of different SWL immobilized preparations at: (a) 60 °C and pH 7,0; (b) 50 °C and pH 9,0; (c) 55 °C and pH 5,0 _____ 95

Figure 5 - Inactivation courses of SWL preparations in the presence of 50% of cosolvent at pH 7 and 4 °C (a) Dioxane; (b) Diglyme; (c) DMF _____ 97

Figure 6 - Effects of detergents on SWL activity. (a) Triton X-100; (b) CTAB; (c) SDS _____ 98

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos de óleos vegetais _____	11
CAPÍTULO II	
Table 1 - P-B experimental design matrix with final pH and lipolytic activity _	30
Table 2 - Process variables and their levels used in CCD _____	31
Table 3 - Experimental design and results of CCD _____	32
Table 4 - Effect estimates for lipolytic activity from the result of Plackett-Burman design _____	35
Table 5 - Coefficient estimates by the regression model in CCD _____	38
CAPÍTULO III	
Table 1 - Influence of k_{La} on cultivation parameters of growing and lipase production by <i>S. warneri</i> EX17 _____	62
CAPÍTULO IV	
Table 1 - Summary of the parameters during the purification of lipase from <i>S. warneri</i> EX17 _____	75
CAPÍTULO V	
Table 1 - Effect of detergents on the stability of SWL preparations _____	99
Table 2 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of (±)-2-O-butryl-2-phenylacetic acid _____	100
Table 3 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of (±)-methyl mandelate _____	101
Table 4 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of HPBEt _____	101

RESUMO

Lipases (EC 3.1.1.3) são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise e síntese de triacilgliceróis. Estas enzimas apresentam estabilidade em diversos solventes orgânicos, podendo ser aplicadas como biocatalisadores em vários processos anteriormente realizados apenas por catalisadores químicos. Este trabalho teve como objetivo produzir, purificar e imobilizar lipases de *Staphylococcus warneri* EX17, cepa capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono. Inicialmente, as condições de cultivo para produção de lipases foram otimizadas através de duas ferramentas de planejamento experimental: delineamento Placket Burman (P-B) e delineamento composto central rotacional (DCCR). Determinou-se que as melhores condições para produção desta enzima são: temperatura de 36 °C; pH 8,1; 30 g/L de glicerol; 3,0 g/L de óleo de oliva e 2,5 g/L de óleo de soja. Também se verificou ser possível a utilização de glicerol residual, oriundo da síntese enzimática de biodiesel como fonte de carbono. O extrato enzimático mostrou-se estável em três solventes orgânicos testados (metanol, etanol e η -hexano). Ainda visando a otimização das condições de cultivo, foram realizados cultivos submersos em biorreatores a fim de estudar a influência da taxa volumétrica de transferência de oxigênio (k_{La}) e do controle do pH, na produção da enzima. A maior produção de lipases ocorreu quando aplicado um k_{La} de 38 h⁻¹ e com o pH controlado em 7,0 ao longo do cultivo, o que permitiu aumentar a produção da enzima em 5 vezes, em relação ao obtido nas condições anteriormente empregadas. A purificação da lipase foi realizada baseando-se no mecanismo de ativação interfacial destas enzimas sobre superfícies hidrofóbicas. Duas resinas foram testadas, octil-Sepharose e butil-Toyopearl. A lipase produzida foi purificada em apenas um passo utilizando esta última resina. Foi estudada a hiperativação da lipase purificada na presença de detergentes, a atividade lipolítica foi aumentada em 2,5 vezes na presença de 0,1% de Triton X-100. A lipase purificada foi imobilizada através de três estratégias: adsorção em suporte hidrofóbico; união covalente unipontual e união covalente multipontual. A influência da imobilização na modulação das propriedades da enzima foi estudada. A lipase apresentou maior estabilidade quando imobilizada multipontualmente. A hidrólise de distintos ésteres quirais pelos diferentes biocatalisadores obtidos também foi estudada. Os ésteres utilizados foram: (±) mandelato de metila, (±)-2-O-butiril-2-fenilacético e (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo. A especificidade da enzima foi muito dependente do método de imobilização, sendo que a lipase imobilizada unipontualmente foi mais específica para o substrato (±)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo, enquanto que para os outros dois substratos foi a lipase adsorvida hidrofobicamente. Este estudo demonstrou que a lipase de *S. warneri* EX17 pode ser produzida utilizando glicerol residual como fonte de carbono, levando a diminuição do custo na produção da enzima, que apresenta propriedades bastante interessantes para sua aplicação em biocatálise.

Palavras-chaves: *Staphylococcus warneri*, lipase, purificação de enzimas, imobilização de enzimas.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) constitute a group of enzymes that catalyze the hydrolysis and synthesis of triacylglycerols. These enzymes show stability in many organic solvents, being able to be used as biocatalysts in some processes that were once carried out only by chemical catalysis. The aim of this research was the production, purification, and immobilization of lipase by *Staphylococcus warneri* strain EX17 using glycerol as carbon source. Initially, the cultivation conditions for the production of lipases have been optimized through two statistical procedures, Plackett-Burman statistical design (PB) and central composite design (CCD). It was determined that the best conditions for this enzyme production are: temperature, 36 °C; pH, 8.1; glycerol, 30 g/L; olive oil, 3.0 g/L; and soybean oil, 2.5 g/L. It was also studied the use of raw glycerol from enzymatic synthesis of biodiesel as carbon source, and stability studies showed that this lipase from *S. warneri* EX17 was stable in methanol, ethanol and n-hexane. Moreover, experiments were conducted in submerged bioreactors in order to study the influence of oxygen volumetric mass transfer rate (k_La) and the control of pH in the production of the enzyme. The higher lipase production occurred when the microorganism was submitted to a k_La of 38 h⁻¹ and the pH controlled at 7.0 during the cultivation, which improved 5-fold the enzyme production, compared to the results obtained in shaker flasks. The lipase purification was carried out based on mechanisms of interfacial activation of these enzymes on hydrophobic surface. Two supports were tested, octyl-Sepharose and butyl-Toyopearl. The lipase produced was purified 20-fold in only one step of purification. The purified lipase was immobilized on cyanogens bromide activated agarose and its hyperactivation in the presence of detergents was studied. The lipolytic activity increased 2.5-fold in presence of 0.1% of Triton X-100. After this, lipase was immobilized by three strategies: adsorption on hydrophobic support, mild covalent attachment, and multipoint covalent attachment. The stability over thermal, organic solvent and detergent inactivation was verified, as well as the influence of the immobilization protocol in the modulation of the properties of the enzyme. The lipase showed higher stability when multipointly immobilized on glyoxyl agarose. The hydrolysis of different chiral esters by the three biocatalysts obtained was also studied. The esters used were: (±) methyl mandelate, ((±) methyl mandelate, (±)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid, (±)-2-hydroxy-4-phenyl-butyric acid ethyl ester. The specificity of the enzyme was highly dependent of the protocol of immobilization, and the lipase mildly immobilized on cyanogen bromide agarose was more specific to the hydrolysis of (±)-2-hydroxy-4-phenyl-butyric acid ethyl ester, while for the other two substrates was the lipase adsorbed on octyl agarose. This study demonstrated that the lipase from *S. warneri* EX17 can be produced using raw glycerol as carbon source, contributing to the reduction in production costs of the enzyme, and the enzyme, when immobilized on different supports, presented quite interesting properties that may be useful as biocatalysts.

Key words: *Staphylococcus warneri*, lipase production, enzyme purification, enzyme immobilization.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a Engenharia Bioquímica tornou-se uma área de grande importância dentro da Engenharia Química, utilizada em diversos setores da economia moderna, melhorando o desenvolvimento de inúmeros processos e produtos. No Brasil, esta área integra a base produtiva de diversos setores da economia, os quais representam parte considerável das exportações nacionais, influenciando a demanda por inovações tecnológicas nos principais setores usuários de Biotecnologia no país.

A área de Engenharia Bioquímica vem sendo fortemente influenciada pelo apelo de desenvolvimento de fontes de energia sustentáveis, podendo desvendar fontes mais novas e limpas de energia reciclável, novos métodos de detectar e tratar contaminações ambientais e desenvolver novos produtos e processos menos danosos ao ambiente do que os anteriormente utilizados. Por suas características produtivas, o biodiesel aparece como uma das possibilidades mais promissoras para o país em termos de desenvolvimento de tecnologias limpas.

Na produção de biodiesel, o principal subproduto obtido é o glicerol, gerando para cada 1000 kg de biodiesel 100 kg de glicerol. Logo, com o aumento evidente da produção deste biocombustível no Brasil, o glicerol residual vai passar a ser um subproduto excedente. Uma alternativa para utilização deste subproduto é a sua conversão em bioprodutos como 1,3-propanediol (monômero básico na indústria de polímeros), ácido cítrico, bioplásticos e produção de enzimas, como lipases.

A maior fatia do mercado industrial de enzimas é ocupada pelas hidrolíticas e, dentro destas, as lipases têm grande destaque. A produção de compostos químicos de alto interesse biotecnológico requer, na maioria das vezes, o uso de enzimas como catalisadores. Durante os últimos 20 anos, foi evidenciado um grande crescimento na aplicação industrial destes biocatalisadores. As razões deste crescimento podem ser resumidas em: alta eficiência catalítica, alta especificidade pelo substrato, biodegradabilidade e alta atividade em condições suaves de temperatura e pressão.

Porém, as lipases são enzimas com alto custo, sendo este um aspecto crítico na implementação de processos enzimáticos de síntese orgânica. Um fator que

poderia levar à diminuição no custo da enzima é a sua produção utilizando substratos de baixo valor agregado, como o glicerol oriundo da síntese de biodiesel. Ainda, no sentido de diminuir o custo de produção da lipase, a utilização de técnicas simples de purificação torna-se um fator de extrema importância, uma vez que esta etapa do processo acarreta em grande parte o custo da enzima.

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

Estes problemas podem ser solucionados através de técnicas de imobilização de enzimas. As principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são: a enzima passa a ser um catalisador heterogêneo, permitindo a sua reutilização e facilitando a separação e extração de substratos e produtos do meio reacional; desenvolvimento de sistemas contínuos; facilidade de controle e automação; maior estabilidade; uso mais eficiente do catalisador; flexibilidade no desenho de reatores; geração de efluentes livres de catalisador. Estas vantagens tornam as reações catalisadas por enzimas imobilizadas potencialmente competitivas econômica e ambientalmente, frente o uso de catalisadores químicos.

Assim sendo, o **objetivo principal** deste trabalho foi estudar a produção, purificação e imobilização de lipases de *Staphylococcus warneri* EX17 produzidas através da utilização de glicerol, subproduto obtido da reação de síntese de biodiesel, como fonte de carbono.

Os **objetivos específicos** foram:

- Selecionar microrganismos produtores de lipases;
- Otimizar a produção de lipases;
- Estudar a viabilidade da produção de lipases por *S. warneri* usando como fonte de carbono glicerol residual, com baixo grau de pureza;

- Estudar o efeito de solventes orgânicos na estabilidade da lipase produzida, visando sua possível aplicação em reações de síntese orgânica;
- Estudar a influência da transferência de oxigênio na produção de lipases utilizando cultivo submerso em biorreatores;
- Purificar a lipase produzida através de suportes hidrofóbicos e estudar sua hiperativação;
- Estudar diferentes métodos de imobilização para lipase produzida e suas implicações nas características da enzima.

Esta tese foi desenvolvida, em sua maioria, nos laboratórios de Enzimologia, Biotecnologia I e II, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS). Parte deste trabalho foi desenvolvido durante um estágio de doutorado realizado no *Laboratório de Biocatálisis*, do *Instituto de Catálisis y Petroquímica (ICP)*, do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)* de Madri, Espanha, sob a orientação do Prof. José Manuel Guisán. O estágio no exterior foi de 8 meses, compreendendo o período de 03/2008 a 10/2008.

Este trabalho está estruturado em cinco partes, além da introdução. O capítulo I traz os embasamentos teóricos pertinente à análise dos resultados, bem como bibliografia encontrada sobre o tema desta tese. Os capítulos II, III, IV e V descrevem as metodologias utilizadas na condução dos experimentos e os resultados obtidos, estes capítulos estão apresentados na forma de artigos científicos, que foram publicados, aceitos e/ou enviados para publicação. As considerações finais sobre o tema desta tese estão apresentadas no capítulo VI. Ao final, estão incluídos alguns apêndices para complementação do trabalho.

Capítulo I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Tecnologia enzimática

As enzimas são biocatalisadores por excelência. Atuando em seqüências organizadas, catalisam reações nas rotas metabólicas dos seres vivos sob condições ideais. Possuem propriedades que convertem os processos enzimáticos em excelentes catalisadores (BORNSCHEUER, 2005):

- 1) Grande eficiência catalítica.
- 2) Elevada especificidade dependendo do seu papel metabólico.
- 3) Atuam em condições suaves de reação (pressão, temperatura e pH).
- 4) Aceitabilidade ambiental, uma vez que são compostos biológicos se degradam completamente no meio ambiente.

Muitas enzimas não são suficientemente estáveis nas condições de reação desejada devido a diversos fatores, como: agitação mecânica, presença de solventes, alta temperatura, pHs extremos, necessidade de cofatores e sua inibição por altas concentrações de substratos e produtos, provocando a perda de sua atividade e especificidade ótimas (KLIBANOV, 1983a). Desta forma, atualmente o principal objetivo da tecnologia enzimática é de superar todos os inconvenientes que impeçam a aplicação de enzimas em processos industriais. Este objetivo pode ser alcançado através da diminuição dos custos de produção, do melhoramento genético para aumentar a expressão da enzima de interesse, da imobilização e estabilização de enzimas, etc.

1.2. Lipases

Lipases são enzimas nomeadas e classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) como triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3. São enzimas hidrolíticas, que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, levando através de uma reação seqüencial, a formação de diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos (MAHADIK *et al.*, 2002; JAEGER e EGGERT, 2002; GUPTA *et al.*, 2004b, CASTRO *et al.*, 2004). A Figura 1 mostra como ocorre esta reação,

sendo que as lipases atuam sobre a ligação éster, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos (REETZ, 2002).

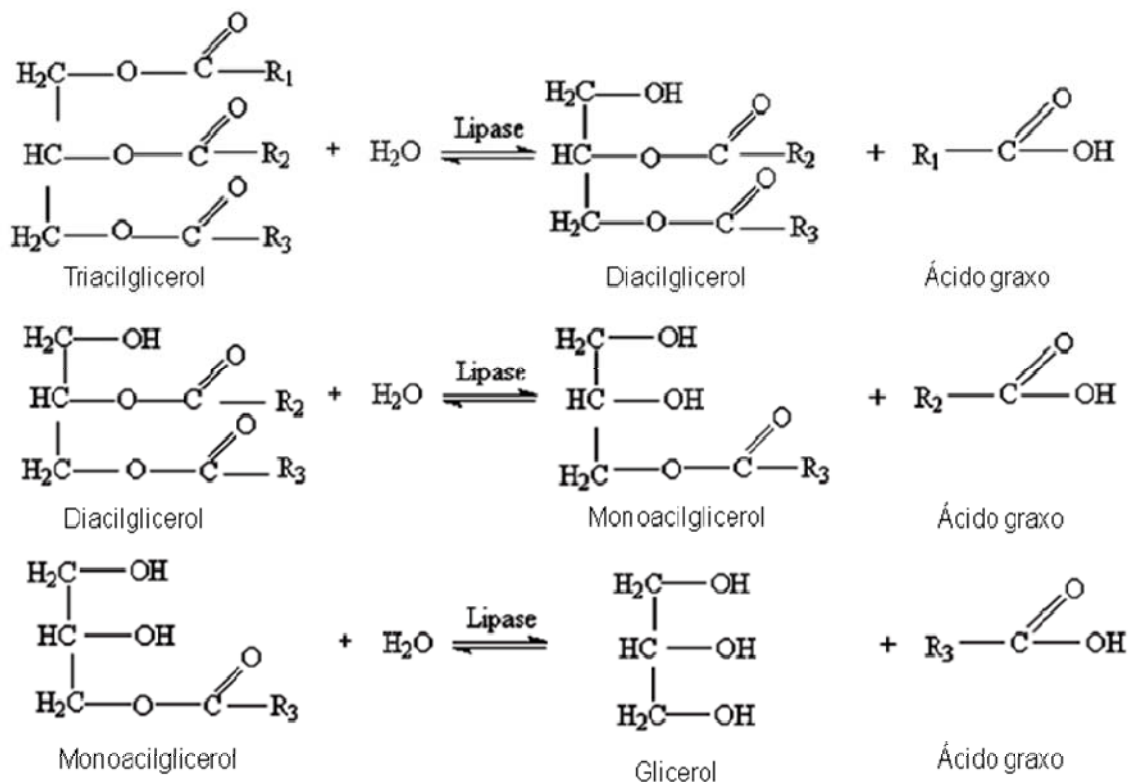


Figura 1 - Reação sequencial de atuação de lipase sobre triacilglicerol (DEREWENDA, 1994).

As lipases são as enzimas mais utilizadas em química orgânica devido a sua especificidade por um grande número de substratos, além de apresentar uma elevada enantioseletividade (KOELLER e WONG, 2001; REETZ *et al.*, 2002). Estas propriedades tornaram as lipases as enzimas com maior uso em biocatálise, por exemplo, em resolução de misturas racêmicas (CONDE *et al.*, 1998; SALAZAR *et al.*, 1999; PALOMO *et al.*, 2002a). No entanto, a especificidade da enzima frente a substratos não naturais pode ser menor que a requerida para fins industriais.

As propriedades catalíticas das lipases podem ser facilmente moduladas pelas condições de reação e pequenas variações na estrutura da enzima podem causar significativas mudanças em suas propriedades. A fim de alcançar um bom rendimento do produto de reação, torna-se necessário realizar a escolha certa dos parâmetros de reação que irão influenciar na atividade, seletividade e estabilidade

da enzima (PALOMO, 2009). A enantioseletividade é uma das características mais interessantes das lipases para sua possível utilização como biocatalisador em química fina, a preparação de enantiômeros puros de intermediários quirais é um passo fundamental em muitos processos industriais relevantes (PALOMO, 2008).

Porém, quando se utiliza lipases como biocatalisadores é preciso levar em consideração algumas peculiaridades do seu mecanismo de ação. Técnicas de cristalografia têm revelado duas diferentes conformações das lipases (DEREWENDA *et al.*, 1992; UPPENBERG *et al.*, 1994; SCHRAG *et al.*, 1997; ERICSSON *et al.*, 2008). Uma onde o sítio ativo da enzima está fechado através de um oligopeptídeo hidrofóbico, chamado de tampa ou *lid*, que cobre a entrada do sítio ativo deixando-o completamente isolado do meio de reação (nesta conformação a lipase é considerada inativa). A segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima; esta tampa desloca-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface hidrofóbica (nesta conformação a lipase é considerada ativa) (Figura 2). Este fenômeno é referido como “ativação interfacial” (BUCHHOLZ *et al.*, 2005). Logo, as lipases preferencialmente atuam em interfaces água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial”, relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsionados (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; JAEGER e REETZ, 1998; SHARMA *et al.*, 2001).

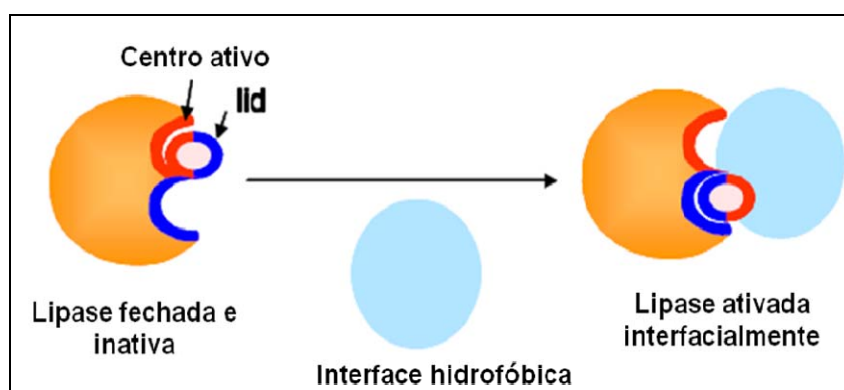


Figura 2 - Ativação interfacial de lipases com interfaces hidrofóbicas.

Esta grande superfície hidrofóbica apresentada pelas lipases quando estão em sua forma aberta, faz com que estas enzimas tenham uma grande afinidade por qualquer tipo de superfície hidrofóbica. Muitos trabalhos relatam a adsorção de lipases em diversas estruturas hidrofóbicas, como, gotas de óleo (BASRI *et al.*, 1995), suportes hidrofóbicos (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998a), bolhas de ar (SUGIURA e ISOBE, 1975), outras proteínas hidrofóbicas (TAIPA *et al.*, 1995), etc.

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 e 75 kDa, são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (CASTRO *et al.*, 2004).

1.3. Produção de lipases

As lipases são amplamente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (bactérias, fungos e leveduras) (KUMAR *et al.*, 2005). As enzimas microbianas são mais interessantes, pois apresentam ampla aplicação industrial devido as suas propriedades enzimáticas, como especificidade, estabilidade, temperatura e pH de atuação, ou habilidade para catalisar reações de síntese na presença de solventes orgânicos (JAEGER e EGGERT, 2002). Vários artigos de produção de lipases por microrganismos têm sido publicados, relatando melhoras na eficiência dos processos de produção e avanços na biologia molecular, permitindo a obtenção de lipases com atividade bem elevada, a um custo mais acessível (HASAN *et al.*, 2006).

1.3.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipases

Microrganismos produtores de lipases têm sido isolados de diversos habitats, como, solos (EL-SHAFEI e REZKALLAH, 1997; HEMACHANDER *et al.*, 2001; HUN *et al.*, 2003; FANG *et al.*, 2006), solos contaminados por óleos (LIMA *et al.*, 2004), efluentes industriais (PRATUANGDEJKUL e DHARMSTHITI, 2000; KUMAR *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005), ambientes salinos (BHATNAGAR *et al.*, 2005), ambientes

quentes (SHARMA *et al.*, 2002; CASTRO-OCHOA *et al.*, 2005), e estuários (AMARAL *et al.*, 2007).

Um estudo realizado por Sharma *et al.* (2001), listou 109 diferentes espécies de microrganismos produtores de lipases; destes, 47 foram obtidas por bactérias, principalmente dos gêneros *Bacillus* (15) e *Pseudomonas* (12), 42 foram obtidas por fungos e 20 por leveduras. Entretanto, a busca e seleção de microrganismos com atividades lipolíticas podem levar à descoberta de novas lipases, com características únicas e adaptadas ao ambiente de onde elas foram isoladas (KUMAR *et al.*, 2005).

Dois métodos qualitativos para seleção de microrganismos produtores de lipases estão bem definidos na literatura. O método descrito por Cardenas *et al.* (2001), utiliza ágar contendo tributirina como substrato e a formação de um halo translúcido ao redor da colônia, gerado pelo consumo do substrato, indica a produção de lipase. Outro método, descrito por Wang *et al.* (1995), utiliza ágar contendo rodamina B, sendo a produção de lipases pelo microrganismo indicada pela presença de um halo laranja avermelhado visível sob luz UV.

1.3.2. Lipases de *Staphylococcus*

A produção de lipases é uma propriedade geral do gênero *Staphylococcus*. Estudos a níveis moleculares, de clonagem e seqüenciamento revelaram que estas lipases apresentam características estruturais comuns. Estas enzimas normalmente são produzidas como preproenzimas, tendo massa molecular de aproximadamente 70 kDa. Após a excreção dentro do meio de cultivo, um processamento proteolítico leva a obtenção da lipase na sua forma madura, com massa molecular variando entre 40 e 46 kDa. Esta transformação se deve, provavelmente, pela ação de uma metalo cisteína-protease (ROLLOF e NORMARK, 1992; SIMONS *et al.*, 1996).

Várias lipases de *Staphylococcus* têm sido purificadas na sua forma madura, e suas propriedades bioquímicas estudadas. A lipase de *S. hycus* teve seu gene pela primeira vez expressado em *Lactobacillus curvatus* por Vogel *et al.* (1990). Mais tarde, estudos demonstraram que a lipase produzida por este microrganismo é cálcio dependente. Foi identificado, com auxílio de mutagênese dirigida, que os resíduos do aminoácido Asp³⁵⁴ e Asp³⁵⁷ são cálcio ligante (SIMONS *et al.*, 1999).

Estudos cristalográficos realizados por Tiesinga *et al.* (2007), permitiram a completa resolução da estrutura tridimensional da lipase de *S. hycus*, podendo através desta ferramenta estudar de forma mais concisa diversas propriedades desta proteína, inclusive elucidando seu mecanismo de ativação interfacial. Atualmente esta lipase é a única deste gênero que tem a estrutura tridimensional completamente resolvida, e depositada no PDB (*Protein Data Bank*) (<http://www.rcsb.org/pdb>) com código de acesso 2 HIH.

A lipase de *S. simulans* também tem sido estudada quanto a sua estrutura tridimensional, porém com auxílio de modelagem matemática (FRIKHA *et al.*, 2008); estes autores se basearam na estrutura de uma lipase cristalizada na forma aberta (lipase de *S. hycus*) e de outra cristalizada na forma fechada (lipase de *B. stearothermophilus*), para desvendar sua estrutura. A lipase de *S. simulans* foi purificada e suas propriedades bioquímicas estudadas pelo grupo do pesquisador Gargouri (SAYARI *et al.*, 2001), mais tarde este mesmo grupo estudou a utilização desta lipase imobilizada em um sistema livre de solvente orgânico, para produção de mono-oleína (GHAMGUI *et al.*, 2006) e de ésteres aromatizantes (KARRA-CHÂABOUNI *et al.*, 2006).

Outras lipases do gênero *Staphylococcus* têm sido estudadas quanto a sua produção, purificação, caracterização bioquímica e molecular e aplicação, entre elas se destacam: *S. xylosus* (MOSBAH *et al.*, 2005; MOSBAH *et al.*, 2007); *S. saprophyticus* (FANG *et al.*, 2006;); *S. aureus* (HYUK *et al.*, 2002; HORCHANI *et al.*, 2008); *S. haemolyticus* (OH *et al.*, 1999); *S. carnosus* (LECHNER *et al.*, 1988; VOIT *et al.*, 1989; VOIT *et al.*, 1991); *S. epidemidis* (SIMONS *et al.*, 1998; JOSEPH *et al.*, 2006); *S. warneri* (TALON *et al.*, 1995; TALON *et al.*, 1996; van KAMPEN *et al.*, 2001).

Atualmente, quatro diferentes sequências de lipases de *S. warneri* estão depositadas em bancos de dados de proteínas, e apenas duas foram estudadas e tiveram seus dados publicados em periódicos. Uma delas foi purificada e caracterizada por Talon *et al.* (1995). Nesse trabalho, foi demonstrado que a produção da lipase esta relacionada com o crescimento do microrganismo, e a lipase de *S. warneri* isolado 863, é excretada no meio de cultivo como uma prolipase, com aparente massa molecular de 90 kDa. Esta prolipase é processada

no meio de cultivo produzindo uma lipase madura de 45 kDa, nomeada SWL1. Neste caso, tanto a prolipase como seus intermediários apresentam atividade lipolítica. van Kampen *et al.* (2001), estudaram a produção de uma nova lipase, produzida por este mesmo isolado (*S. warneri* 863). Estes autores clonaram esta lipase na sua forma madura em *E. coli*, esta lipase foi nomeada como SWL2, apresentando massa molecular de 43 kDa. Embora estas duas lipases (SWL1 e SWL2), sejam produzidas pelo mesmo isolado, e apresentaram massa molecular semelhante, suas seqüências de aminoácidos não foram idênticas, apresentando apenas 53 % de identidade.

1.4. Condições de cultivo para produção de lipases

Muitos estudos têm sido realizados para definir condições ótimas de cultura e necessidades nutricionais para produção de lipases por culturas submersas. A produção de lipases é influenciada pelo tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio, pH do meio de cultivo, temperatura de crescimento, e pela concentração de oxigênio dissolvido (GUPTA *et al.*, 2004b). O fator nutricional de maior importância na produção de lipase é a fonte de carbono, pois são enzimas induzíveis sendo geralmente produzidas na presença de fontes lipídicas, como óleos, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, Tweens, sais biliares e glicerol (SHARMA *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2004a; GUPTA *et al.*, 2007). O óleo de oliva é uma fonte de lipídio amplamente usada devido a alta quantidade de ácido oléico presente neste óleo, sendo este considerado em estudos de Gordilho *et al.* (1998), o melhor indutor para a produção de lipases. A Tabela 1 apresenta a composição de ácidos graxos de diversos óleos vegetais, onde se verifica que o óleo de oliva contém em sua composição a maior quantidade de ácido oléico.

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos de óleos vegetais (g/100 g). Adaptado de Gurr *et al.*, 2002

Óleo vegetal	Ácidos Graxos Saturados				Ácidos Graxos Insaturados			
	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C _{16:1}	C_{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}
Algodão	-	1	24	3	1	19	53	0,5
Amendoim	48	18	9	3	T	6	2	T
Canola	-	-	4	2	0,5	56	26	10
Gergelim	-	-	9	6	T	38	45	1
Girassol	-	-	6	6	T	18	69	T
Milho	-	-	13	3	T	31	52	1
Oliva	-	-	10	2	-	78	7	1
Palma	-	1	43	4	0,5	41	10	T
Soja	T	T	11	4	T	22	53	8

T – traços. A composição de ácido oléico está destacada.

As condições nutricionais e físico-químicas têm sido estudadas na produção de lipases por microrganismos em cultivos submersos. Lin *et al.* (2006) testaram diversas fontes de carbono, nitrogênio, minerais e vitaminas na produção de lipase por *Antrodia cinnamomea*, e obtiveram a maior atividade lipolítica (54 mU/mL) utilizando 50 g/L de glicerol, 5 g/L de NaNO₃, e 1 g/L de tiamina, pH inicial de 5,5 e temperatura de 25 °C. Burkert *et al.* (2004) otimizou as condições de cultivo para produção de lipase por *Geotrichum sp.*, e obteve atividade de 20 U/mL utilizando óleo de soja (6 g/L) e água de maceração de milho (130 - 150 g/L) como fontes de carbono, NH₄NO₃ (21 -25 g/L) como fonte de nitrogênio, os cultivos foram realizados a 30 °C. Utilizando um meio salino, complementado com 5 g/L de óleo de gergelim e 0,1 g/L de traços de elementos, Maia *et al.* (2001) obtiveram atividade lipolítica máxima de 0,89 U/mL por *Fusarium solani* em 100 h de cultivo, o pH inicial e temperatura usados foram de 5,5 e 28 °C, respectivamente. Atividade lipolítica de 14,2 U/mL utilizando *Aspergillus terreus* foi obtida a partir de um meio salino, complementado com 2 g/L de glicose, 1 g/L de caseína e 20 g/L de óleo de milho emulsificado com 100 g/L de goma acácia (GULATI *et al.*, 2000). Outras fontes nutricionais têm sido investigadas, sendo que a fonte de carbono é o fator mais

estudado na produção de lipase, principalmente o uso de óleos vegetais, por se tratar de indutores desta enzima (CHEN *et al.*, 1999; PRATUANGDEJKUL e DHARMSTHITI, 2000; HEMACHANDER *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2002).

A concentração de oxigênio disponível para os microrganismos também é um parâmetro muito importante para produção de lipases, muitos trabalhos têm demonstrado o aumento da produtividade das lipases em sistemas com alta transferência de oxigênio (CHEN *et al.*, 1999; ELIBOL e OZER, 2000; AMARAL *et al.*, 2007). O oxigênio disponível dentro do meio de cultivo constitui um fator decisivo para o crescimento de microrganismos, uma aeração eficiente depende da solubilização do oxigênio e da sua taxa de difusão no meio de cultivo (GALACTION *et al.*, 2004).

Amaral *et al.* (2007) utilizaram perfluorocarbono (PFC) para aumentar o oxigênio dissolvido no meio de cultura para produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. PFC's são compostos completamente inertes, derivados de hidrocarbonetos, formados pela substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor. A solubilidade do oxigênio em PFC's é 10 a 20 vezes maior que em água. Estes autores conseguiram um aumento na produção da enzima de até 23 vezes quando utilizado no meio de cultivo 20 % de PFC, em relação aos controles sem PFC.

1.4.1. Utilização de glicerol como substrato

O item anterior cita as diversas fontes de carbono que vem sendo utilizadas para produção de lipases. Porém, poucas investigações têm sido realizadas utilizando glicerol como substrato para produção de lipases (GUPTA *et al.*, 2004a; LIN *et al.*, 2006). Portanto, este estudo vem a ser muito importante, uma vez que o glicerol se tornará um subproduto excedente quando o biodiesel for produzido em larga escala comercial (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2005; LEVINSON *et al.*, 2007).

Atualmente, muitos estudos têm como objetivo a conversão microbiológica de glicerol a vários produtos e sua utilização como fonte de carbono para o crescimento microbiano. O glicerol vem sendo amplamente utilizado para produção de 1,3-propanediol, que é um monômero básico usado na produção de polímeros (CHENG

et al., 2007; VILLEGAS, 2007; ZHENG *et al.*, 2008). A produção de ácido cítrico por leveduras utilizando glicerol tem sido reportada há vários anos (LEVINSON *et al.*, 2007), porém o interesse pela utilização de glicerol residual, oriundo da síntese de biodiesel para produção deste bioproduto, aparece pela primeira vez no trabalho de Papanikolaou *et al.* (2002). Estes autores demonstram que o glicerol residual, oriundo da síntese de biodiesel, com 60 % de pureza, é um substrato adequado para produção de ácido cítrico por *Yarrowia lipolytica*. Ito *et al.* (2005), estudaram a produção de hidrogênio e etanol por *Enterobacter aerogenes* HU-101 utilizando glicerol presente no efluente da síntese de biodiesel, com 41 % de pureza, e demonstraram um alto rendimento, e alta taxa de produção dos bioprodutos desejados.

Embora a utilização de glicerol e glicerol residual tem sido bastante estudada para produção de alguns bioprodutos, poucos estudos estão sendo realizados visando a produção de enzimas utilizando glicerol como fonte de carbono para o microrganismo produtor. Souza *et al.* (2006) demonstraram que o glicerol foi a melhor fonte de carbono para formação de biomassa e produção de transglutaminase por *Bacillus circulans* BL32.

Um dos focos deste trabalho é a produção microbiana de lipase utilizando glicerol e/ou glicerol residual (oriundo da síntese de biodiesel) como fonte de carbono. Na literatura foram encontrados apenas dois trabalhos que demonstram a utilização de glicerol para produção de lipases. Lin *et al.* (2006) estudaram diversas fontes de carbono para produção de lipases por *Antrodia cinnamomea* e obtiveram a maior atividade lipolítica utilizando glicerol. O glicerol também foi a melhor fonte de carbono para produção de lipase por *Bacillus* sp., sendo que o meio otimizado continha 10 mL/L de glicerol (GUPTA *et al.*, 2004a).

Uma das aplicações das lipases, depois de purificada total ou parcialmente, é a sua utilização na síntese de biodiesel. A produção de biodiesel utilizando biocatalisador apresenta como principal vantagem, frente ao uso de um catalisador químico, que o subproduto da reação, glicerol, apresenta um alto grau de pureza, muitas vezes não necessitando de processo de recuperação (CHANG *et al.*, 2005). Embora a síntese enzimática de biodiesel tenha sido patenteada em 1997 (HAAS, 1997), este processo ainda não foi implementado industrialmente, devido

principalmente a algumas restrições, como inibição da enzima pelos alcoóis presentes na reação de síntese, exaustão da atividade enzimática e alto custo da enzima (RANGANATHAN *et al.*, 2008). Logo, estudos de produção de lipase através de um subproduto gerado na própria reação catalisada por esta enzima, fechando um ciclo de produção de biodiesel e enzima, além do estudo de estratégias que melhorem a atividade da enzima são de grande importância.

1.5. Cultivo submerso

Atualmente a estratégia de cultivo melhor definida para produção de lipases é a de cultivo submerso (YANG *et al.*, 2005). Os cultivos submersos podem ocorrer de duas formas: em incubadora rotatória, onde os controles de pH e transferência de oxigênio são mais difíceis; ou em biorreatores, que permitem o controle de diversos parâmetros.

O parâmetro mais importante no cultivo em biorreator é a transferência de oxigênio, que pode ser descrita e analisada através de medidas do coeficiente volumétrico de transferência de massa, k_La (GALACTION *et al.*, 2004). Os valores de k_La são afetados por vários fatores, como as características geométricas e operacionais dos biorreatores, composição do meio de cultivo, concentração e morfologia do microrganismo (CHISTI e JAUREGUI-HAZA, 2002).

Como discutido no item 1.4, a taxa de transferência de oxigênio é um fator de grande importância na produção de lipase. Gupta *et al.* (2007), otimizaram a produção de lipase por *Burkholderia multivorans* realizando cultivos em incubadora rotária orbital e, nas condições otimizadas, realizaram cultivos também em biorreator de 17 L, com taxa de aeração de 4 L/min e a agitação variou de 300 a 400 rpm, os níveis de produção de lipase no biorreator foram similares aos obtidos em incubadora, porém o tempo requerido para alcançar a máxima atividade lipolítica foi reduzido de 36 h para 15 h, indicando que o aumento de oxigênio no meio de cultivo acelerou o metabolismo do microrganismo, quanto a produção da enzima.

1.6. Purificação de lipases

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, devido a isto, as etapas de purificação são tão ou mais desafiantes que o estudo e desenvolvimento da etapa de cultivo, pois não há processos de purificação de aplicação geral (PESSOA JR. e KILIKIAN, 2005).

A maioria das lipases microbianas são extracelulares e o processo de cultivo é usualmente seguido pela remoção das células do meio de cultivo. O meio livre de células pode ser concentrado por ultrafiltração, ou a precipitação das proteínas pode ser feita diretamente pela adição de sulfato de amônio ou extração com solventes orgânicos (SCOPES, 1993). Saxena *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre os métodos de purificação e verificaram que cerca de 80 % dos sistemas de purificação utilizam esta etapa de precipitação; destes, 60 % usam sulfato de amônio e 35 % usam etanol, acetona ou um ácido, seguido pela combinação de algum método cromatográfico. Estes autores também verificaram que entre os métodos cromatográficos, a cromatografia de troca iônica é o mais utilizado (67 %), e o trocador iônico mais empregado são os grupos dietilaminoetil (DEAE) para troca aniônica (58 %) e carboximetil (CM) para troca catiônica (20 %). O segundo método mais utilizado é a gel filtração (60 %), seguida pela cromatografia de afinidade (27 %). Outro método cromatográfico, porém menos utilizado para purificação de lipases é a cromatografia de interação hidrofóbica (18 %), onde os adsorventes hidrofóbicos mais utilizados são dos grupos fenil e octil.

Chen *et al.* (2007) purificaram a lipase produzida por *Bacillus cereus* C71 utilizando a seguinte estratégia: primeiramente realizaram a precipitação com sulfato de amônio até concentração de 60 %, em seguida fizeram uma cromatografia de interação hidrofóbica utilizando como trocador fenil-Sepharose, após este procedimento a amostra foi adicionada em uma coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose) e, finalmente, a amostra foi submetida a uma coluna CIM QA, que consiste em um material monolítico polimérico, com alta eficiência nos processos de separação de proteínas. A lipase produzida foi purificada 1092 vezes, com 18 % de

rendimento, a massa molecular da enzima foi de aproximadamente 42 kDa. Esta lipase apresentou pH ótimo de 9,0 e temperatura ótima de 33 °C.

Kumar *et al.* (2005) purificaram a lipase produzida por *Bacillus coagulans* BTS-3 através da precipitação das proteínas com sulfato de amônio, em seguida aplicaram as proteínas ressuspendidas e dialisadas com tris-HCl 0,1 M, respectivamente, em uma coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose). Uma purificação de 40 vezes foi alcançada e o peso molecular determinado foi de 31 kDa, determinado por SDS-PAGE. Os valores ótimos de pH e temperatura foram 8,5 e 55 °C, respectivamente.

Palomo *et al.* (2004b) purificam a lipase produzida por *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2) clonada em *E. coli* através de um método bastante simples. O mecanismo de ativação interfacial das lipases, faz com que estas enzimas sejam adsorvidas em um suporte hidrofóbico (octil agarose), seguido pela desorção com Triton X-100 na concentração de 0,2 %, apenas uma banda foi detectada por SDS-PAGE, indicando a total purificação da enzima, o peso molecular da lipase produzida foi de 94 kDa.

Baseando-se novamente no mecanismo de atuação das lipases, Palomo *et al.*, 2004a, desenvolveram uma simples e eficiente ferramenta de purificação de lipases. A hipótese destes autores consistiu na imobilização de uma lipase comercial (*Pseudomonas fluorescens*) a um suporte, no caso glioxil agarose, de forma que o sítio ativo da enzima ficasse exposto ao meio, permitindo a adsorção de outras moléculas de lipase via um mecanismo similar ao da agregação apresentado por estas enzimas. Estes autores conseguiram adsorver seletivamente lipases presentes nos extratos de *Bacillus thermocatenulatus* (BTL2), *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae* e *Humicola Lanuginosa*, atualmente chamada *Thermomices Lanuginosa*. Baixas concentrações de detergente foram suficientes para que ocorresse a total desorção da lipase de interesse.

1.7. Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas tem um importante papel dentro da biotecnologia aplicada, pois a utilização de enzimas como biocatalisadores está normalmente limitada pela falta de estabilidade nas condições operacionais do processo, e

também pela dificuldade de recuperar e reciclar o biocatalisador. Portanto, a enzima necessita ser altamente estável ou tornar-se altamente estabilizada durante a imobilização para ser aplicada em um processo industrial (MATEO *et al.*, 2007).

Uma vez que a enzima esteja imobilizada, ou adsorvida a um suporte, passa de ser um catalisador solúvel a apresentar as seguintes vantagens como catalisador heterogêneo:

- 1) Reutilização ou uso contínuo.
- 2) Fácil separação da mistura de reação.
- 3) Possibilidade de modular as propriedades catalíticas.
- 4) Prevenção de uma contaminação microbiana.
- 5) Possível estabilização da estrutura tridimensional da enzima.

As propriedades dos derivados enzimáticos (enzima imobilizada) são determinadas tanto pelas características da enzima como pelas do suporte em que se imobiliza. A interação entre os dois irá resultar em um derivado enzimático com propriedades químicas, bioquímicas e mecânicas específicas (TISCHER e KASCHE, 1999). Como para outros processos físicos ou químicos, tanto a velocidade como o rendimento de imobilização estão determinados por vários parâmetros, incluindo: o tipo de suporte, o método de imobilização, a concentração de enzima e de grupos reativos no suporte, o pH, a temperatura e o tempo de reação (BUCHHOLZ, 1979).

1.7.1. Estratégias de imobilização de enzimas

Os métodos para imobilização de enzimas podem ser classificados em duas categorias básicas: imobilização por ligação em suportes e encapsulamento (BUCHHOLZ *et al.*, 2005).

A imobilização por ligação em suportes pode ser realizada através da ligação da enzima ao suporte por adsorção, onde a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, ligações iônicas, etc; ou por ligação covalente, onde as enzimas são covalentemente ligadas ao suporte através de seus grupos funcionais, que não são essenciais para a atividade catalítica (D'SOUZA, 1999).

1.7.1.1. Adsorção interfacial sobre suportes hidrofóbicos

No caso das lipases, sua tendência de adsorver-se a superfícies hidrofóbicas (ativação interfacial) pode ser empregada para desenvolver um protocolo de imobilização específico para estas enzimas (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008), usando como suportes, por exemplo, octil-agarose (BASTIDA *et al.*, 1998), octadecil-Sepabeads (PALOMO *et al.*, 2002b) e inclusive sobre hidrofobinas imobilizadas em glioxil-agarose (PALOMO *et al.*, 2003b), a baixa força iônica. Nestas condições, as lipases “confundem” a superfície do suporte com a superfície hidrofóbica das gotas de óleo, seu substrato natural, de forma a se adsorverem fortemente a estes suportes, através do *lid* e de sua grande superfície hidrofóbica, que está em torno do sítio ativo, imobilizando-se na sua conformação aberta (PERNAS *et al.*, 2001; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2003; PALOMO *et al.*, 2003a). Este tipo de imobilização permite em um único passo, a purificação, imobilização e hiperativação interfacial das lipases (Figura 3).

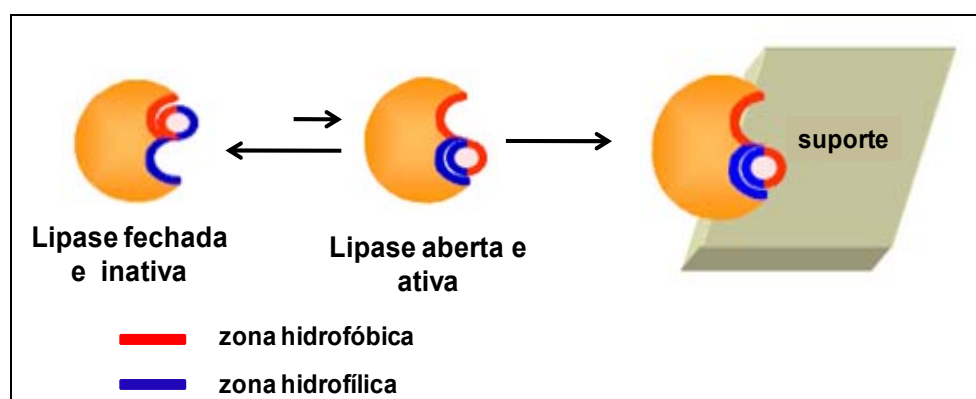


Figura 3 - Adsorção interfacial de lipases sobre uma superfície hidrofóbica.

1.7.1.2. Imobilização por união covalente

A metodologia da ligação covalente baseia-se na ativação de grupos químicos do suporte para que reajam com os nucleófilos das proteínas. Dentre os 20 aminoácidos diferentes que se encontram na estrutura das enzimas, os mais empregados para a formação de ligações com o suporte são principalmente lisina, cisteína, tirosina e histidina, e em menor medida metionina, triptofano, arginina e ácido aspártico e glutâmico. Os restantes dos aminoácidos, devido a seu caráter

hidrofóbico, não se encontram expostos para o exterior da superfície protéica, e não podem intervir na ligação covalente (ARROYO, 1998).

A ligação covalente de enzimas a suportes sólidos pré-existentes é uma das estratégias mais utilizadas devido, principalmente, as seguintes propriedades conferidas aos derivados enzimáticos obtidos por este sistema (KLIBANOV, 1983b; LECKBAND e LANGER, 1990; ALONSO, 1996):

- 1) Caráter covalente, portanto a estabilidade da ligação.
- 2) Estabilização adicional que se pode obter quando a interação for multipontual, levando a uma maior resistência à desativação por efeito de temperatura, solventes orgânicos ou pH.
- 3) Fácil manipulação do derivado, e com isso a possível modificação das propriedades químicas ou catalíticas.
- 4) A carga de enzima permanece constante após a imobilização.
- 5) Os derivados podem ser utilizados em reatores contínuos, empacotados, de leito fluidizado ou tanque agitado.

Neste trabalho foram estudadas duas formas de imobilização covalente, unipontual e multipontual. A imobilização unipontual de enzimas acontece quando a interação entre a enzima e o suporte ocorre por uma única ligação. Este método pode ser realizado utilizando suporte de agarose ativado com brometo de cianógeno, gerando uma ligação covalente entre a enzima e o suporte (GUISÁN, 1988). Esta imobilização se realiza a baixa temperatura e a pH 7, onde a interação da enzima sobre o suporte possivelmente ocorre pelo grupo amino mais reativo da proteína (o amino terminal), deste modo praticamente não existe rigidificação da enzima. Essa técnica pode produzir uma enzima imobilizada com propriedades muito similares às da enzima solúvel, permitindo o estudo da enzima livre de fenômenos intermoleculares.

Outra forma de imobilização covalente é a imobilização covalente multipontual. Este processo envolve a ligação covalente de enzimas em suportes pré-existentes altamente ativados através de resíduos presentes na superfície da enzima, promovendo uma rigidificação da estrutura da enzima quando imobilizada (GUISÁN *et al.*, 1987).

Esta estratégia de imobilização de enzimas pode ser realizada através do emprego de géis de agarose ativados, de forma que sua superfície se apresente coberta de aldeídos (gel de glioxil), moderadamente distantes da parede do suporte e totalmente expostos ao meio, de forma que os grupos amino das enzimas possam reagir com o suporte (GUISÁN, 1988) (Figura 4).

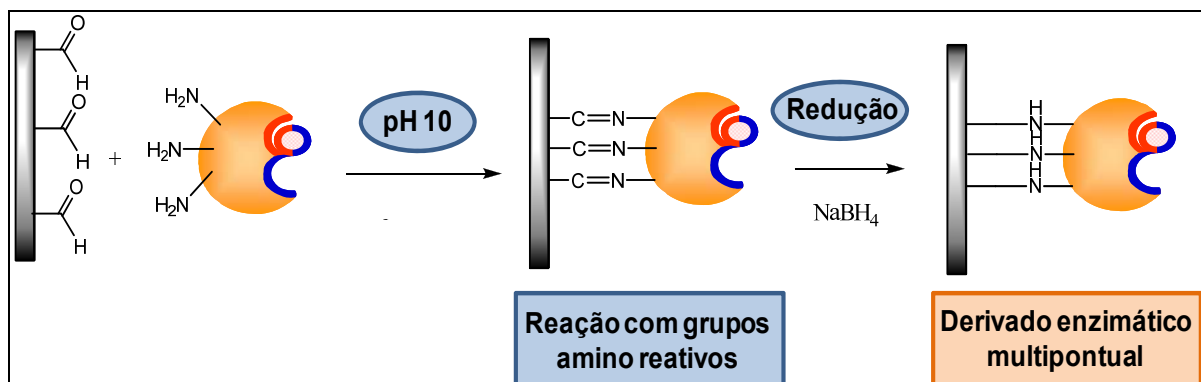


Figura 4 - Imobilização covalente multipontual de enzimas sobre suportes glioxil-agarose.

Segundo diversos autores (FERNÁNDEZ-LAFUENTE e GUISÁN, 1998; MATEO *et al.*, 2006), as principais variáveis que podem controlar o grau de multinteração entre a enzima e o suporte são:

- 1) Temperatura de imobilização: o uso de temperaturas moderadamente altas pode promover uma maior flexibilidade da estrutura da proteína, favorecendo sua reatividade com os grupos do suporte.
- 2) Tempo de imobilização: de forma que se possa alcançar um correto alinhamento das moléculas da enzima e o suporte.
- 3) pH do meio: esta é uma variável de extrema importância, uma vez que o pH influi na reatividade dos grupos da superfície da proteína, por exemplo, as lisinas tem um pK em torno a 10, sendo pouco reativas a pH neutro.

1.8. Aplicação de lipases

As lipases pertencem a um importante grupo de enzimas biotecnologicamente relevantes devido a sua atividade catalítica em meios aquosos e não aquosos. São amplamente utilizadas em diversos processos industriais como na indústria de detergentes, oleoquímica, em processos de tratamento de efluentes, na modificação de óleos e gorduras, na indústria farmacêutica e podem ser utilizadas em reações de sínteses orgânicas (SHARMA *et al.* 2001; REETZ, 2002; GUPTA *et al.*, 2004b; GUPTA *et al.*, 2007).

Os aspectos biológicos e fisiológicos relacionados à produção, bem como à aplicação industrial de enzimas lipolíticas, têm sido bastante estudados e, nos últimos anos, a pesquisa sobre lipases tem sido intensificada devido à descoberta, relativamente recente, da capacidade das lipases de catalisar reações de síntese e sua surpreendente estabilidade em diversos solventes orgânicos, abrindo inúmeras possibilidades no campo da síntese química, onde as diferentes seletividades de lipases de várias fontes, aliada às condições suaves de temperatura e pressão em que atuam, apresentam uma enorme vantagem em relação aos catalisadores convencionais (REETZ, 2002).

Dentre as diversas possibilidades de utilização de lipases como catalisadores de reações químicas, muitos trabalhos destacam a produção de biodiesel usando catálise enzimática por lipases livres ou imobilizadas. A produção industrial de biodiesel é geralmente realizada pela metanólise de óleos vegetais, usando catalisadores químicos. Este processo necessita de excessivo requerimento energético e gera poluição ambiental devido à geração de resíduos (SHIMADA *et al.*, 2002). Lipases com capacidade de catalisar reações de transesterificação em solventes orgânicos são consideradas como um importante biocatalisador para produção de biodiesel (JAEGER e EGGERT, 2002). Comparado com o método químico, o método enzimático simplifica o procedimento para recuperação de metil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e dos subprodutos gerados (glicerol), eliminando a geração de resíduos (YANG *et al.*, 2007).

1.9. Utilização de ferramentas estatísticas

Atualmente, o uso de ferramentas estatísticas, como delineamentos de Plackett-Burman (P-B), planejamento experimental e superfície de resposta têm sido amplamente utilizados para seleção dos parâmetros mais importantes através de um número mínimo de experimentos, e otimização das condições de cultivo (KALIL *et al.*, 2000).

Planejamento experimental é um conjunto de técnicas freqüentemente utilizadas em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (parâmetros) sobre variáveis de saída (respostas). Este processo pode abranger diferentes áreas, como a engenharia química, biotecnologia, pesquisas na área agrícola, melhoria de processos industriais novos e antigos, bem como em processos que utilizam simulação computacional (BOX *et al.*, 1978; KHURI e CORNELL, 1987; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Por meio do planejamento experimental, a análise de um determinado processo é realizada utilizando-se um número menor de experimentos quando comparado às metodologias convencionais, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação, com redução de tempo e custos (NETO *et al.*, 1996).

Um dos métodos de avaliação do planejamento experimental é a análise e otimização através de superfícies de resposta. Obtêm-se, assim, relações empíricas entre uma ou mais respostas de interesse, que são medidas analíticas, e um determinado número de fatores, que são controlados e influenciam a resposta do processo. Desta forma, este estudo permite que se verifique, quantifique e otimize esta influência, sendo possível a obtenção das melhores condições para realização de determinado processo e/ou para a obtenção de um produto com as características desejadas (NETO *et al.*, 1996; RODRIGUES e IEMMA, 2005). Com os resultados obtidos no planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, especificar os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear, de primeira ordem, ou um modelo quadrático, de segunda ordem, correlacionando as variáveis de entrada e as respostas (XU, 2003).

Muitas estratégias têm sido eficientemente empregadas para aumentar a produção de enzimas pelos microrganismos. Entre elas, a seleção dos fatores que influenciam nas condições de cultivo e a otimização destes fatores para produção de enzimas é um passo importante para futura aplicação comercial e envolve o estudo de parâmetros físico-químicos como composição do meio de cultivo, seleção das fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e densidade ótica do inóculo (GUPTA *et al.*, 2004a).

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS II, III, IV E V

Os capítulos II, III, IV e V, estão apresentados em forma de artigos científicos, e estão organizados conforme as normas propostas pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPGEQ).

Estes capítulos trazem os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, juntamente com os resultados obtidos e as conclusões de cada etapa.

No primeiro artigo (Capítulo II – “Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate”), foram determinadas as melhores condições de cultivo para a produção de lipase e a sua produção utilizando glicerol residual, oriundo da síntese enzimática de biodiesel, como fonte de carbono, além da estabilidade do extrato enzimático frente distintos solventes orgânicos. Este artigo está publicado no periódico *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83:821-828, 2008. Doi: 10.1002/jctb.1875.

O segundo artigo (Capítulo III - “Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17”) trata do efeito da transferência de oxigênio e do pH na produção de lipase por *S. warneri* no meio previamente otimizado. Este artigo está publicado no periódico *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14:105-111, 2009. Doi: 10.1007/s12257-008-0040-5.

O terceiro artigo desta tese (Capítulo IV – “Purification and hyperactivation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17”) aborda a etapa de purificação utilizando suportes hidrofóbicos, além do estudo da influência de detergentes na hiperativação da lipase estudada. Este artigo foi submetido para publicação no periódico *Process Biochemistry* em novembro de 2008.

No quarto artigo (Capítulo V – “Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques”) foram estudadas diferentes estratégias de imobilização da lipase de *S. warneri* EX17 e suas implicações nas propriedades da enzima. Este artigo está aceito para publicação no periódico *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

**Capítulo II - PRODUCTION OF ORGANIC SOLVENT TOLERANT
LIPASE BY *Staphylococcus caseolyticus* EX17 USING RAW
GLYCEROL AS SUBSTRATE**

Artigo publicado no periódico: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*,
83:821-828, 2008. Doi: 10.1002/jctb.1875.

**Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus*
EX17 using raw glycerol as substrate**

Giandra Volpato^{1,2}, Rafael Costa Rodrigues^{1,2}, Júlio Xandro Heck³, Marco Antônio
Záchia Ayub^{1,2*}

¹Department of Chemical Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Professor Luiz Englert, s/n, ZC 90040-040, Porto Alegre, RS, Brazil

²Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Technical School, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Ramiro Barcelos, 2777, ZC 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: mazayub@ufrgs.br (M.A.Z. Ayub).

Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate

Abstract

BACKGROUND: In this work we used Plackett–Burman statistical design and central composite design in order to optimize culture conditions for lipase production by *Staphylococcus caseolyticus* strain EX17 growing on raw glycerol, which was obtained as a by-product of the enzymatic synthesis of biodiesel. The stability of lipase was verified over several organic solvents, such as methanol, ethanol and n-hexane.

RESULTS: Optimal culture conditions for lipase production were found to be 36 °C, initial pH 8.12, glycerol 30.0 g L⁻¹, olive oil 3.0 g L⁻¹, and soybean oil 2.5 g L⁻¹, with 145.8 U L⁻¹ of enzyme activity. When commercial glycerol was substituted by the raw glycerol from biodiesel synthesis, lipolytic activity was 127.3 U L⁻¹. Experimental validation of enzyme production matched values predicted by the mathematical model, which was 138.3 U L⁻¹. Stability tests showed that lipase from *S. caseolyticus* EX17 was stable in methanol, ethanol, and n-hexane.

CONCLUSIONS: Results obtained in this work suggest that raw glycerol can be used for lipase production by *S. caseolyticus* EX17 and that this enzyme has a potential application in the synthesis of biodiesel.

Key words: lipase; *Staphylococcus caseolyticus*; Plackett-Burman design; central composite design; raw glycerol; enzyme stability.

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) are enzymes widely distributed in nature that catalyze the hydrolysis of fat and oils¹. Although lipases are produced by many species of animals, plants, bacteria, yeasts, and filamentous fungi, the enzymes from microorganisms are the most interesting owing to their potential industrial applications such as in food, dairy products, pharmaceuticals, detergents, textiles, biodiesel synthesis, cosmetics, and in the synthesis of fine chemicals, agrochemicals, and polymeric materials^{2,3}. Each of these applications requires unique enzyme properties with respect to specificity, stability, temperature, pH, and their ability to catalyze synthetic ester reactions in organic solvents. Therefore, the screening of microorganisms with lipolytic activities is essential research aiming to the discovery of novel lipases⁴.

Numerous carbon sources, such as Tween 80, triolein, yeast extract, olive oil, soybean oil, silk oil, sesame oil, coconut oil, and corn oil, have been used as substrates to produce lipases in cultures of bacteria⁵⁻¹¹. However, very few investigations have been carried out using glycerol as substrate^{12,13} and none using raw glycerol, which is the by-product of the transesterification of vegetable oils with alcohols in the reaction to produce biodiesel¹⁴.

Media optimization for the production of enzymes is an important step for commercial applications and involves the study of a number of physicochemical parameters, such as medium composition, carbon and nitrogen sources selection, pH, temperature, and inoculum size¹⁵. Recently, the use of statistical approaches involving Plackett–Burman (P-B) designing and response surface methodology (RSM) have been widely used for media optimization and for the understanding of interactions among various parameters using a minimum number of experiments¹⁶.

The aims of this work were the optimization of culture conditions in order to maximize lipase production by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using statistical design, and to investigate the possible use of raw glycerol obtained during the enzymatic synthesis of biodiesel as a carbon source for lipase production by this bacterium. The obtained lipase was studied for its stability in organic solvents that are commonly used in enzymatic synthesis of biodiesel.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism: maintenance and inoculum preparation

We isolated the bacterium *Staphylococcus caseolyticus*, identified by us as strain EX17, from an abattoir fat-rich wastewater. It was maintained at 4 °C on LB agar plate containing (g L⁻¹): peptone, 10; yeast extract, 5; NaCl, 5. Inocula were prepared in 125 mL Erlenmeyer flasks filled with 25 mL LB medium and inoculated with a loopful from a stock culture. Cells were cultivated at 150 rpm, 37 °C, for 18 h. The inoculum optical density (OD) was always adjusted to 1.0. This procedure was used as the standard inoculum preparation for all experiments.

2.2. Cultivation procedures

Cultures were prepared in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of different production media. Media composition, pH, temperature, and the size of inoculum transferred varied according to the experimental design described in Table 1, except for the contents of peptone (10 gL⁻¹) and raw yeast extract (autolyzed unpurified yeast extract, Prodesa, Brazil) (5 gL⁻¹), which were used as basal media nutrients in all experiments. The media were sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. Media were emulsified in a blender at maximum speed for 30 s, and incubated in a rotatory shaker at 150 rpm. Samples were taken along the 48 h of cultivation to determine lipolytic and proteolytic activities, pH, and optical density.

2.3. Experimental design

2.3.1. Plackett–Burman statistical design

To determine which nutrients and conditions had a significant effect on lipase production, P-B design was used¹⁷. In our work, ten variables and five dummy variables were screened in 20 trials, with four replicates in the central point. The minimum and maximum ranges selected for the ten parameters are given in Table 1, in which each column represents an independent variable. Variables with confidence levels >95% were considered to have significant influence on lipase production.

Table 1 - P-B experimental design matrix with final pH and lipolytic activity

Trial no.	Variables ^a /levels ^b										Final pH	Lipolytic activity (U.L ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀		
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	7.42	135.1
2	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	4.14	0.2
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	8.46	28.0
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	8.36	22.5
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	5.59	6.7
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	3.97	7.1
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	4.16	0.9
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	4.95	1.2
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	4.25	5.5
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	6.84	133.4
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	4.22	4.2
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	5.79	33.7
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	4.78	1.2
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	4.62	6.7
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	7.38	43.1
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.34	134.7
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.23	1.3
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.12	1.8
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.30	1.3
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.27	1.2

^a X₁ soybean oil: (-) = 5 g.L⁻¹, (+) = 20 g.L⁻¹; X₂ olive oil: (-) = 5 g.L⁻¹, (+) = 20 g.L⁻¹; X₃ Triton X-100: (-) = 0 g.L⁻¹, (+) = 5 g.L⁻¹; X₄ gum arabic: (-) = 0 g.L⁻¹, (+) = 10 g.L⁻¹; X₅ glycerol: (-) = 0 g.L⁻¹, (+) = 30 g.L⁻¹; X₆ glucose: (-) = 0 g.L⁻¹, (+) = 15 g.L⁻¹; X₇ (NH₄)₂SO₄: (-) = 0 g.L⁻¹, (+) = 5 g.L⁻¹; X₈ Initial pH: (-) = 5.0, (+) = 8.0; X₉ temperature: (-) = 25 °C, (+) = 37 °C; X₁₀ inoculum optical density: (-) = 5 % (v/v), (+) = 10 % (v/v). ^b (-) lower level, (+) higher level; (0) central point.

2.3.2. Central composite design

The optimization of key culture conditions to maximize lipolytic activity was determined applying the central composite design methodology (CCD). The variables and coded and uncoded values of the variables at various levels are given in Table 2.

Table 2 - Process variables and their levels used in CCD

Variable	Parameters	Variables Levels				
		-2.38	-1	0	+1	+2.38
X ₉	Temperature (°C)	27	33	37	41	47
X ₈	Initial pH	6.0	7.16	8.0	8.84	10.0
X ₅	Glycerol (g.L ⁻¹)	5.0	19.5	30.0	40.5	55.0
X ₂	Olive oil (g.L ⁻¹)	0	1.5	2.5	3.5	5.0
X ₁	Soybean oil (g.L ⁻¹)	0	1.5	2.5	3.5	5.0

Table 3 shows 50 trials of the five variables, each at five levels. The design was made up of a central composite design with eight replications of the central point and the ten axial points. In each case, the lipolytic activity was determined. Second-order polynomial equation for the variables was as follows:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

where Y is the response variable, β_0 the constant, β_i the coefficient for the linear effect, β_{ii} the coefficient for the quadratic effect, β_{ij} the coefficient for the interaction effect, x_i and x_j are the coded level of variable X_i and X_j . The above quadratic equation was used to plot surfaces for the variables.

The test variables were coded according to the following regression equation:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (2)$$

where x_i is the coded value and X_i is the actual value of the independent variable, X_0 is the actual value at the central point, and ΔX_i is the step change value.

Table 3 - Experimental design and results of CCD

Trial no.	Variables/levels					Lipolytic activity (U.L ⁻¹)	
	X ₉	X ₈	X ₅	X ₂	X ₁	Experimental	Predicted
1	-1	-1	-1	-1	-1	22.12	38.24
2	-1	-1	-1	-1	+1	70.47	57.09
3	-1	-1	-1	+1	-1	64.29	57.35
4	-1	-1	-1	+1	+1	57.34	77.75
5	-1	-1	+1	-1	-1	87.40	80.81
6	-1	-1	+1	-1	+1	90.70	88.72
7	-1	-1	+1	+1	-1	111.61	94.70
8	-1	-1	+1	+1	+1	100.40	104.16
9	-1	+1	-1	-1	-1	79.49	84.90
10	-1	+1	-1	-1	+1	76.94	74.81
11	-1	+1	-1	+1	-1	121.56	105.87
12	-1	+1	-1	+1	+1	119.60	97.33
13	-1	+1	+1	-1	-1	69.99	76.18
14	-1	+1	+1	-1	+1	44.46	55.15
15	-1	+1	+1	+1	-1	72.96	91.94
16	-1	+1	+1	+1	+1	85.91	72.46
17	+1	-1	-1	-1	-1	32.07	13.93
18	+1	-1	-1	-1	+1	34.26	39.41
19	+1	-1	-1	+1	-1	16.65	22.09
20	+1	-1	-1	+1	+1	56.58	49.12
21	+1	-1	+1	-1	-1	21.69	50.04
22	+1	-1	+1	-1	+1	40.11	64.58
23	+1	-1	+1	+1	-1	34.08	52.99
24	+1	-1	+1	+1	+1	98.73	69.08
25	+1	+1	-1	-1	-1	53.79	75.25
26	+1	+1	-1	-1	+1	65.25	71.80
27	+1	+1	-1	+1	-1	85.66	85.27
28	+1	+1	-1	+1	+1	81.88	83.37
29	+1	+1	+1	-1	-1	72.81	60.08
30	+1	+1	+1	-1	+1	53.89	45.68
31	+1	+1	+1	+1	-1	74.65	64.89
32	+1	+1	+1	+1	+1	30.15	52.04
33	-2.38	0	0	0	0	28.74	39.82
34	2.38	0	0	0	0	2.94	-13.36
35	0	-2.38	0	0	0	2.11	-3.34
36	0	2.38	0	0	0	31.64	31.87
37	0	0	-2.38	0	0	53.46	58.90
38	0	0	2.38	0	0	82.94	72.26
39	0	0	0	-2.38	0	98.56	76.41
40	0	0	0	2.38	0	89.79	106.70
41	0	0	0	0	-2.38	115.24	104.67
42	0	0	0	0	2.38	106.47	111.81
43	0	0	0	0	0	140.08	134.67
44	0	0	0	0	0	130.71	134.67
45	0	0	0	0	0	134.23	134.67
46	0	0	0	0	0	135.01	134.67
47	0	0	0	0	0	133.32	134.67
48	0	0	0	0	0	134.19	134.67
49	0	0	0	0	0	134.17	134.67
50	0	0	0	0	0	139.12	134.67

2.4. Analytical methods

The cell-free supernatant of the culture broth, referred to as the crude enzyme extract, was used for the estimation of enzymatic activities and for pH determinations using a standard lab pHmeter.

Lipolytic activity was determined using p-nitrophenyl palmitate (pNPP) as the substrate¹⁸. A volume of 0.15 mL crude enzyme extract was mixed with 1.35 mL of the prepared substrate solution and incubated at 37 °C for 15 min in a water bath. Control containing heat-inactivated enzyme was also incubated with each assay. The mixture was centrifuged (14 000 × g, 10min, 10 °C) and the reaction was measured as absorbance at 410 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol p-nitrophenol min⁻¹ at 37 °C. Under these conditions the extinction coefficient of p-nitrophenol is 95.17 L g⁻¹. Proteolytic activity was measured by the azocasein method, according to Sarath et al.¹⁹. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to produce the change in one unit of absorbance under the conditions of the method.

Biomass was quantified gravimetrically as cell dry weight. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried at 80 °C to a constant weight. Glycerol concentration was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index (RI) detector (Series 200, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) and a Phenomenex RHM monosaccharide column (300 × 7.8 mm), at 80 °C, using ultrapure water as eluent, flow of 0.6 mL min⁻¹, and a sample volume of 20 μL.

2.5. Raw glycerol production

Experiments were performed comparing the optimized medium utilizing pure glycerol and raw glycerol. Raw glycerol was obtained from the enzymatic production of biodiesel. The reaction was carried out in a shaker with substrate molar ratio of 6:1 (ethanol:soybean oil), 15 % immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM, Novozymes Latin America, Parana, Brazil), at 150 rpm and 37 °C for 48 h. After the reaction was finished, the mixture reaction was washed with 500mL distilled water, and maintained in a separator funnel for 24 h. The lower

phase, containing the glycerol, excess ethanol, and water, was separated by distillation under 138 kPa vacuum in a rotatory evaporator at 80 °C.

2.6. Effect of organic solvents on the stability of crude enzyme extract

Three organic solvents (methanol, ethanol, and nhexane) were added to the crude enzyme extract in concentrations of 25 % (v/v), and incubated for 30 min at 37°C and 150 rpm. The residual lipase activity was measured using pNPP as substrate. These experiments were carried out in triplicate.

2.7. Data analysis

All experimental designs and results analyses were done using Statistica 7.0 (Statsoft, Tulsa, UK, USA). Statistical verification of the model was performed as analysis of variance (ANOVA). The significance of the regression coefficients and the associated probabilities, $p(t)$, were determined by Student's t-test; the second order model equation significance was determined by Fisher's F-test. The variance explained by the model is given by the multiple determination coefficients, R^2 . For each variable, the quadratic models were represented as contour plots (2D).

3. Results and discussion

3.1. Screening of culture conditions

P-B experimental design was used to evaluate the impact of the contents of soybean and olive oils, triton X-100, gum arabic, glycerol, glucose, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, initial pH, temperature, and inoculum size (v/v), on lipase production by *S. caseolyticus* EX17. Table 1 shows the P-B experimental design for 20 trials with two levels of concentrations for each variable and the corresponding lipolytic activities, which varied between 0.2 and 135.1 U L⁻¹. This variation reflects the importance of optimization to attain higher enzyme productions. The variables and their ranges were chosen based on the literature^{13,20}. As expected, results show that the growth of *S. caseolyticus* EX17 on media containing glucose (trials 2, 9, 11, and 14) or glucose and glycerol (trials 6, 7, 8, 13, and 17) produced a sharp decrease of culture pH due to the production of organic acids. When glycerol was the only added carbon source (trials 1, 5, 10 and 12), pH remained almost unchanged.

Table 4 shows the statistical analysis of the studied variables on lipase production. Although we followed the growth kinetics for 48 h, the highest enzyme activities were always observed at 24 h of cultivation, probably due to inactivation of lipase by either medium acidification or proteolysis²¹. Thus, results in Table 4 represent the activities at 24 h of growth. All variables were found to be significant at the 95 % level. The main observation drawn from the P-B study is that there was no enzyme induction associated with the increase of contents of vegetable oils, which contrasts with many previous reports in which lipases were generally induced by increased amounts of these substrates^{4,6,9}. Perhaps the presence of glycerol, not used by other authors, will turn oils more readily available to cells, allowing higher enzyme induction with lower amounts of substrate. Indeed, in our study, lipase production was induced by glycerol. Gupta et al.¹³ and Lin et al.¹², working respectively with *Bacillus* sp. and *Antrodia cinnamomea*, also described the induction of this enzyme by glycerol. It can be hypothesized that glycerol will either enhance oil solubility or act as a cell permeabilizer enhancing enzyme activity.

Table 4 - Effect estimates for lipolytic activity from the result of Plackett-Burman design

Variables	Parameters	Effect
X ₁	Soybean oil	-12.21
X ₂	Olive oil	-20.90
X ₃	Triton X-100	-18.05
X ₄	Gum arabic	-39.57
X ₅	Glycerol	9.28
X ₆	Glucose	-63.77
X ₇	(NH ₄) ₂ SO ₄	-7.39
X ₈	Initial pH	15.99
X ₉	Temperature	10.85
X ₁₀	Inoculum	-7.79

Standard Error = 0.139; p-values = <0.0001

In addition to the carbon source, the nitrogen source is an important parameter for lipase production. In our study, it was found that inorganic nitrogen ((NH₄)₂SO₄) induced proteolytic activity (data not shown), contrary to other reports on the literature¹¹, showing a negative effect on lipolytic activities (Table 4), but this effect might be explained by the fact that different microorganisms will respond differently to nitrogen sources. The combination of peptone and raw yeast extract, the organic nitrogen sources tested by us, produced insignificant proteolytic activities and it was therefore chosen as the nitrogen source. Chen et al.¹¹ reported lipase production by *Acinetobacter radioresistens* in a medium that contained 10 g L⁻¹ tryptone and 5 g L⁻¹ yeast extract, but these authors also used 1 g L⁻¹ NH₄Cl as nitrogen source in order to inhibit proteolytic activity. Surprisingly, the components used as emulsifiers, triton X-100 (X₃) and gum arabic (X₄), which were added with the objective of inducing and maintaining the emulsification of oils in the culture medium, produced negative effects on lipolytic activity. This result contrasts with some previous reports that consider emulsification an essential procedure in order to increase the bioavailability of lipids to cells and, as a consequence, increase lipolytic activities^{4,22}. Again, the presence of glycerol might be a key element modifying the oil metabolism by cells. The variables initial pH (X₈) and temperature (X₉) showed highly positive effects on lipolytic activities, 15.99 and 10.85, respectively. The effects of these two factors on enzyme activity will be further discussed in the CCD experiments. The factor volume of inoculum (X₁₀) showed a negative effect (-7.79). This can be explained by the fact that the enzyme was found to be partially growth-associated, a product of late log-phase, therefore requiring cell growth and accumulation for its production (see Fig. 2).

3.2. Central composite designs (CCD)

Based on the results of P-B design, for the next step of optimization, the concentrations of triton X-100 (X₃), gum arabic (X₄), glucose (X₆), (NH₄)₂SO₄ (X₇), volume of inoculum (X₁₀) were set at their lower levels. Considering the tested levels of variables concentration of soybean oil (X₁) and olive oil (X₂), they produced negative effects. Therefore, according to the P-B theory, they should be maintained at their minimal concentrations. In the CCD, we then tested these two variables in

the range between 0 and 5 g L⁻¹. The glycerol concentration (X₅), initial pH (X₈) and temperature (X₉) were selected owing to their positive effects over lipase production. Cultures were carried out under the best conditions attained by PB design with unbuffered and buffered media, both with initial values of pH at 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, and 10.0. Surprisingly, lipolytic activity was higher in unbuffered media (data not shown). Therefore, all further experiments were carried out under unbuffered conditions.

Table 3 presents the CCD with the experimental results for lipase production in 24 h of culture. The highest activity, 135 ± 3 U L⁻¹, was obtained with all variables at the central point (temperature of 37 °C, initial pH 8.0, glycerol 30 g L⁻¹, olive oil 2.5 g L⁻¹, and soybean oil 2.5 g L⁻¹). The lowest lipolytic activity was observed for the lowest initial pH (6.0), and highest temperature (47 °C), 2.11 U L⁻¹ and 2.94 U L⁻¹, respectively (trials 34 and 35). Lin et al.¹² found that glycerol (50 g L⁻¹) was the best carbon source for lipolytic activity by *Antrodia cinnamomea*, obtaining an enzyme activity of 27 U L⁻¹. Bhatnagar et al.²³ working with halobacteria *Natronococcus* sp., found the highest lipolytic activity of 45 U L⁻¹ at pH 7.5 and temperature in the range 35–40 °C.

ANOVA showed that the model was highly significant ($P < 0.0001$), with $R^2 = 0.88$; thus 88 % of the total variation is explained by the model. This suggests a satisfactory representation of the process model and a good correlation between the experimental and predicted values.

Table 5 shows the significance of coefficients determined by Student's t-test and P -values. The high significance of temperature and initial pH on first- and second-order model terms and the interaction between them indicates that the physicochemical variables can act as limiting factors and even small variations in their values will alter this enzyme production by *S. caseolyticus* EX17²⁴. The linear coefficients for glycerol, olive, and soybean oil, in the tested range by CCD, presented positive effects and were highly significant, according to P -values. The interactions between the initial pH and olive oil and between the olive oil and soybean oil were the only statistically nonsignificant for lipase production. Whenever possible, models are simplified by the elimination of statistically insignificant terms. We proposed then that the second-order polynomial model should be reduced to

$$Y = 134.7 - 11.2 x_9 + 7.4 x_8 + 2.8 x_5 + 6.4 x_2 + 1.5 x_1 - 21.5 x_9^2 - 21.3 x_8^2 - 12.2 x_5^2 - 7.6 x_2^2 - 4.7 x_1^2 + 3.7 x_9 x_8 - 1.6 x_9 x_5 - 2.7 x_9 x_2 + 1.6 x_9 x_1 - 12.8 x_8 x_5 - 7.2 x_8 x_1 - 1.3 x_5 x_2 - 2.7 x_5 x_1 \quad (3)$$

where Y is the predicted response for lipolytic activity, and x_9 , x_8 , x_5 , x_2 , and x_1 are the coded values of temperature, initial pH, glycerol, olive oil, and soybean oil, respectively.

Table 5 - Coefficient estimates by the regression model in CCD

Independent variables	Coefficient (β)	Standard error	t-value	p-value
Intercept	134.67	1.07	125.14	<0.0001
X_9^*	-11.18	0.46	-23.99	<0.0001
$X_9 X_9^*$	-21.46	0.41	-52.17	<0.0001
X_8^*	7.40	0.46	15.88	<0.0001
$X_8 X_8^*$	-21.28	0.41	-51.73	<0.0001
X_5^*	2.81	0.46	6.02	0.0005
$X_5 X_5^*$	-12.21	0.41	-29.68	<0.0001
X_2^*	6.36	0.46	13.66	<0.0001
$X_2 X_2^*$	-7.62	0.41	-18.52	<0.0001
X_1^{**}	1.50	0.46	3.22	0.0146
$X_1 X_1^*$	-4.67	0.41	-11.35	<0.0001
$X_9 X_8^*$	3.66	0.54	6.76	0.0002
$X_9 X_5^{**}$	-1.61	0.54	-2.97	0.0206
$X_9 X_2^*$	-2.73	0.54	-5.04	0.0014
$X_9 X_1^{**}$	1.65	0.54	3.05	0.0183
$X_8 X_5^*$	-12.82	0.54	-23.64	<0.0001
$X_8 X_2$	0.46	0.54	0.85	0.4199
$X_8 X_1^*$	-7.23	0.54	-13.34	<0.0001
$X_5 X_2^{**}$	-1.30	0.54	-2.40	0.0471
$X_5 X_1^*$	-2.73	0.54	-5.04	0.0014
$X_2 X_1$	0.38	0.54	0.71	0.4981

*Statistically significant at 99% of confidence level. **Statistically significant at 95% of confidence level.

The entire relationship between reaction variables and response can be better understood by examining the planned series of contour plots depicted in Figure 1, which was generated from the predicted model by keeping constant the olive oil concentration (1.5, 2.5 and 3.5 g L⁻¹) and initial pH (7.2, 8.0, and 8.8). The soybean oil concentration was fixed in the optimum value (2.5 g L⁻¹) for all plots. The application of contour plots could be employed to study the effects on lipase production simultaneously in a quadruple-variable plot¹⁴. All nine contour plots exhibited a similar profile for the predicted lipolytic activity, reaching its maximum at 33 °C and decreasing above 40 °C. The optimum glycerol concentration was around 30 g L⁻¹, decreasing enzyme activity for concentrations lower than 20 g L⁻¹ and higher than 40 g L⁻¹. For the initial pH, the maximum activity occurred in the range 7.5–8.8, and for olive oil in the range 2.5–3.5 g L⁻¹. Results obtained with the CCD concerning the concentrations of the oils confirmed the P-B indication that these substrates could be reduced in amount without reducing enzyme activities. This study confirms that P-B statistical design followed by CCD is a fundamental combination in order to properly define the important variables and their levels to obtain optimized lipase production by microorganisms.

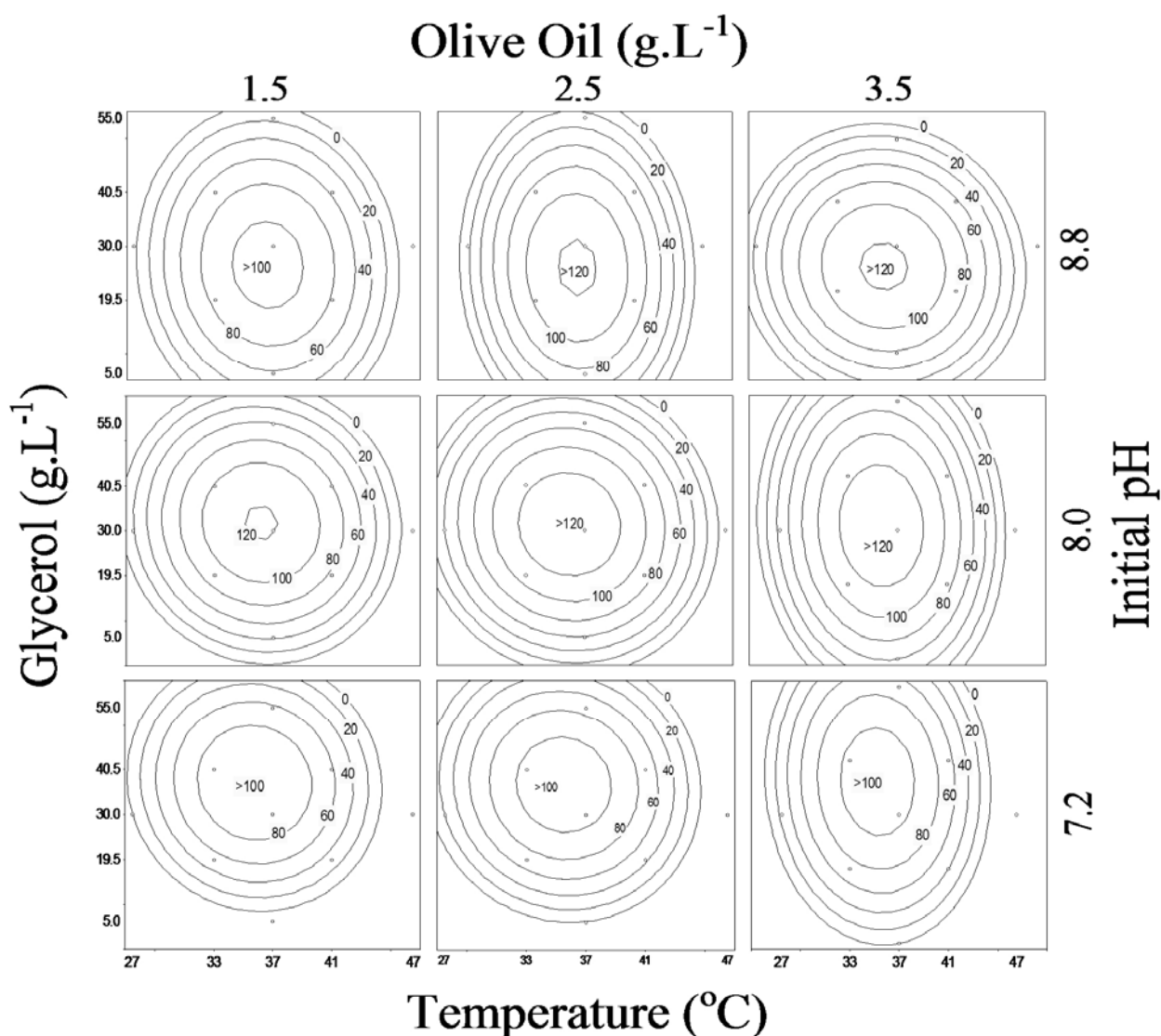


Figure 1 - Contour plots of lipolytic activity. Concentration of soybean oil fixed in the optimum value (2.5 g.L⁻¹). The numbers inside the contour plots indicate lipolytic activity in U.L⁻¹.

3.3. Lipase production using raw glycerol and model validation

Raw glycerol can become an important surplus by-product when biodiesel is produced on a large commercial scale²⁵. A mass balance of the process shows that for each 1000 kg of biodiesel produced from vegetable oils, 100 kg glycerol is released as by-product²⁵. Few studies using raw glycerol as substrate for bioproducts production are found in the literature. Papanikolaou et al.²⁵ used raw glycerol as carbon source in the production of citric acid. To confirm the applicability

of the obtained model, we ran experiments comparing the optimized médium using pure glycerol and raw glycerol. The raw glycerol was obtained from the reaction of biodiesel synthesis, with purity of 65 % determined by HPLC (results not shown). Cultivation conditions, according to the model, were: temperature 36 °C, initial pH 8.12, concentration of glycerol 30 g L⁻¹, concentration of olive oil 3.0 g L⁻¹, and soybean oil 2.5 g L⁻¹. In this case, the coded settings of the tested variables were $X_9 = -0.28$, $X_8 = 0.14$, $X_5 = 0.03$, $X_2 = 0.47$, and $X_1 = 0$. Figure 2 shows the time course of lipase production by *S. caseolyticus* EX17 cultivated under optimized culture conditions with either pure or raw glycerol. The highest lipolytic activities were 145.8 U L⁻¹ and 127.3 U L⁻¹ for pure and raw glycerol, respectively. This result suggests that the experimental and predicted (138.3 U L⁻¹) values of lipolytic activity were in good agreement, confirming the model validation. Also, the profile of lipase production, dry biomass and glycerol consumed, in pure and raw glycerol were similar. These results indicate that raw glycerol was an adequate substrate for lipase production by *S. caseolyticus* EX17. We also observed that the lipolytic activity was partially growth-associated. This result suggests that the cell produces lipases in order to obtain the energy required to form new cells from the available carbon sources, and at the same time it does so as a normal metabolic activity irrespective of growth. This profile is similar to that reported by Shu et al.²⁶ for lipase production by *Antrodia cinnamomea* growing in synthetic médium with glucose and olive oil in an air lift bioreactor; and for lipase production by *Aspergillus terreus* growing in batch glucose and corn oil culture, as reported by Gulati et al.²⁷.

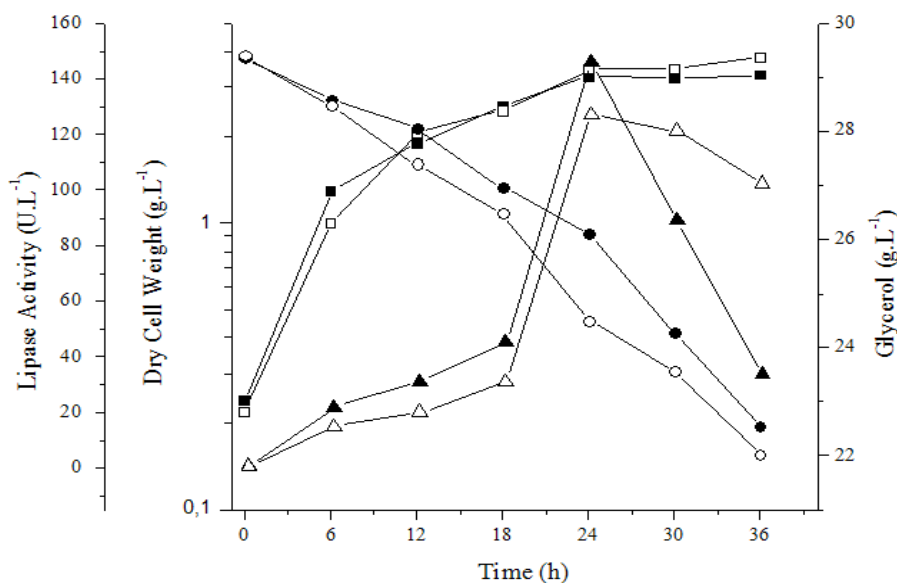


Figure 2 - The time course of lipase production by *S. caseolyticus* EX17 cultivated under optimized culture conditions with pure glycerol (solid symbols) and raw glycerol (open symbols): (square) = dry cell weight, (triangle) = lipolytic activity, (circle) = glycerol concentration.

Comparing results of lipolytic activities with those of other research studies is difficult owing to the different methodologies used by different groups. However, comparing the results obtained in our work with those reported using the same methodology and reaction substrate (pNPP), they were similar to those obtained by Maia et al.⁸, who obtained lipolytic activities of around 150 U L^{-1} in submerged cultures of *Fusarium solani* (vegetable oils as carbon source), and higher than activities found by Bhatnagar et al.²³ (45 U L^{-1} for halobacteria); Lin et al.¹² (54 U L^{-1} for *Antrodia cinnamomea*); and Lima et al.²⁸ (30 U L^{-1} for *Penicillium aurantiogriseum*), all of them in submerged cultures. The lipase activity was also similar to that found by Dominguez et al.²⁹, approximately 160 U L^{-1} , but these authors used p-nitrophenol laurate as a substrate for the enzymatic reaction.

3.4. Effects of organic solvents on lipase stability

Organic solvents are known to be extremely toxic to crude enzymatic extracts, probably because they cause denaturation of enzymes even at very low

concentrations of 0.1% (v/v) and only organic solventtolerant lipases, especially to methanol and ethanol, can distinctly improve the biodiesel production²¹. In recent years, few bacterial lipases showing such chemical tolerance have been reported. Among these, certain strains of *Staphylococcus*²¹ and *Bacillus*³⁰ species have been isolated. In this study, three organic solvents were investigated: methanol, ethanol and n-hexane. These solvents are widely used in biodiesel synthesis. The lipase activity of strain EX17 was stimulated 1.5-fold when 25 % (v/v) n-hexane was added to the crude enzyme extract. Similar effects were observed for lipase from *Bacillus sphaericus* 205y³⁰. For methanol, the lipase of strain EX17 was stable when this solvent was added to the crude enzyme extract, showing a residual activity of 83 %. In contrast, Fang et al.²¹ found only 32 % of residual lipase activity for *S. saprophyticus* in the presence this solvent. In the presence of ethanol, the residual activity of strain EX17 lipase was 41 %, similarly found by the same authors, who showed a residual activity of 36 % in this solvent²¹. Therefore, the lipase obtained in our study can be considered to be stable in n-hexane and methanol, and partially stable in ethanol. Thus, it can be very useful for biodiesel production.

4. Conclusions

The present study demonstrated that the use of P-B statistical design and CCD can be used in combination to determine significant variables and best conditions for lipase production by *S. caseolyticus* EX17. The results obtained for cultivations using raw glycerol as substrate for cell growth showed that it is possible to use this abundant, cheap, and surplus by-product of biodiesel synthesis for lipase production by this strain. This is extremely important for the economic feasibility of biotechnological processes and, therefore, our results can indicate future integration of lipase production and biodiesel synthesis. Moreover, the crude enzymatic extract of *S. caseolyticus* EX17 was shown to be stable in organic solvents such as methanol and ethanol, and its activity was even enhanced in the presence of n-hexane, justifying its use as a biocatalyst in biodiesel production. The results found in our work grant further research on the production, purification, characterization, and applications of lipase from *S. caseolyticus* EX17.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES and CNPq for scholarships and financial support for this research.

References

1. Reetz MT, Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 6:145–150 (2002).
2. Hasan F, Ali Shah A and Hameed A, Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39:235–251 (2006).
3. Jaeger KE and Eggert T, Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 13:390–397 (2002).
4. Kumar S, Kikon K, Upadhyay A, Kanwar SK and Gupta R, Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expr Purif* 41:38–44 (2005).
5. Li CY, Chen SJ, Cheng CY and Chen TL, Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. *Biochem Eng J* 25:195–199 (2005).
6. Burkert JFM, Maugeri F and Rodrigues MI, Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresour Technol* 91:77–84 (2004).
7. Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Gupta LK and Gupta JK, Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem* 37:1075–1084 (2002).
8. Maia MMD, Heasley A, Morais MMC, Melo EHM, Morais MA, Ledingham WM, et al, Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Bioresour Technol* 76:23–27 (2001).
9. Hemachander C, Bose N and Puvanakrishnan R, Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem* 36:629–633 (2001).

10. Pratuangdejkul J and Dharmsthiti S, Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiol Res* 155:95–100 (1999).
11. Chen JY, Wen CM and Chen TL, Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol Bioeng* 62:311–316 (1999).
12. Lin ES, Wang CC and Sung SC, Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb Technol* 39:98–102 (2006).
13. Gupta N, Mehra G and Gupta R, A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology. *Can J Microbiol* 50:361–368 (2004).
14. Chang HM, Liao HF, Lee CC and Shieh CJ, Optimize synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 432. *J Chem Technol Biotechnol* 80:307–312 (2005).
15. Gupta R, Gupta N and Rathi P, Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 64:763–781 (2004).
16. Kalil SJ, Maugeri F and Rodrigues MI, Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochem* 35:539–550 (2000).
17. Plackett RL and Burman JP, The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika* 33:305–325 (1946).
18. Winkler UK and Stuckmann M, Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138:663–670 (1979).

19. Sarath G, de la Motte RS and Wagner FW, Proteases assay methods, in *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach*, ed. By Beyon RJ and Bond JS. IRL, Oxford, p. 25–55 (1989).
20. Oda M, Kaieda M, Hama S, Yamaji H, Kondo A, Izumoto E, et al, Facilitatory effect of immobilized lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells on acyl migration in biodiesel-fuel production. *Biochem Eng J* 23:45–51 (2005).
21. Fang Y, Lu Z, Lv F, Bie X, Liu S, Ding Z, et al., A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. *Curr Microbiol* 53:510–515 (2006).
22. Castro-Ochoa LD, Rodriguez-Gómez C, Valerio-Alfaro G and Ros RO, Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb Technol* 37:648–654 (2005).
23. Bhatnagar T, Boutaiba S, Hacene H, Cayol JL, Fardeau ML, Ollivier B, et al, Lipolytic activity from Halobacteria: screening and hydrolase production. *FEMS Microbiol Lett* 248:133–140 (2005).
24. Adinarayana K, Ellaiah P, Srinivasulu B, Devi RB and Adinarayana G, Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem* 38:1565–572 (2003).
25. Papanikolaou S, Muniglia L, Chevalot I, Aggelis G and Marc I, *Yarrowia lipolytica*, a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol* 92:737–744 (2002).
26. Shu CH, Xu CJ and Lin GC, Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem* 41:734–738 (2006).
27. Gulati R, Saxena RK and Gupta R, Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. *Process Biochem* 36:149–155 (2000).

28. Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA and Fontana JD, Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochem Eng J* 18:65–71 (2004).
29. Dominguez A, Pastrana L, Longo MA, Rúa ML and Sanroman MA, Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem Eng J* 26:95–99 (2005).
30. Hun CJ, Rahman RNZA, Salleh AB and Barsi M, A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochem Eng J* 15:147–151 (2003).

**Capítulo III - EFFECTS OF OXYGEN VOLUMETRIC MASS
TRANSFER COEFFICIENT AND pH ON LIPASE PRODUCTION**

BY *Staphylococcus warneri* EX17

Artigo publicado no periódico: *Biotechnology and Bioprocess Engineering*,
14:105-111, 2009. Doi: 10.1007/s12257-008-0040-5.

Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17

Giandra Volpato, Rafael Costa Rodrigues, Júlio Xandro Heck, Marco Antônio Záchia Ayub

¹Department of Chemical Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Professor Luiz Englert, s/n, ZC 90040-040, Porto Alegre, RS, Brazil

²Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Technical School, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Ramiro Barcelos, 2777, ZC 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6685; fax: +55 51 3308 7048

E-mail address: mazayub@ufrgs.br (M.A.Z. Ayub).

Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17

Abstract

The aims of this work were to investigate the kinetics of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 over different conditions of oxygen volumetric mass transfer coefficients (k_{La}) and pH in submerged bioreactors using glycerol, a biodiesel by-product, as carbon source. Cultivations were carried out at different k_{La} (26 h^{-1} , 38 h^{-1} , 50 h^{-1} , and 83 h^{-1}) and pH values (6.0, 7.0 and 8.0). The optimal k_{La} and pH were 38 h^{-1} and 7.0, respectively. Under these conditions the maximal cell production obtained was 8.0 g/L, and the volumetric and specific lipase production reached high activities of approximately 800 U/L and 150 U/g cell, respectively, after 12 h of cultivation. This result was about five times higher than that obtained in shake flask cultures. The relationship between cell growth and lipase production was found to be growth-associated by the Luedeking-Piret model.

Key words: Lipase, *Staphylococcus warneri*, bioreactor, oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_{La}).

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol hydrolase, E.C. 3.1.1.3) are lipolytic enzymes, which catalyze the hydrolysis of the ester linkage of long chain acylglycerols at oil/water interfaces [1]. These enzymes have the ability to catalyze several reactions of industrial interest, such as esterification and transesterification, and can be used in food technology, detergent, chemical industry and biomedical sciences [2-4]. These enzymes are also the most widely used in organic synthesis [5].

Lipases are mainly produced from microbial sources. In particular, bacterial lipases play a vital role in commercial applications. Some important lipase-producing bacterial genera include *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus* [6]. Microbial lipase production is reported to be affected by pH and temperature of cultivation, medium composition and oxygen tension, among a number of other factors [7]. Oxygen transfer rates have been indicated by some authors as a key factor influencing lipase production by microorganisms, with reported correlation between the increase of productivity with the increase of oxygen availability to cells [4,8,9]. Oxygen volumetric mass transfer rate is usually a critical parameter in aerobic cultures of microorganisms due to its poor solubility and the need for constant supply. Selection, design, and scale up of biochemical reactors and the accurate estimation of mass transfer rates for different scales and different operational conditions are of critical importance in bioprocesses [10]. The oxygen transfer rate can be described and analyzed by means of oxygen volumetric mass transfer coefficient, $k_L a$. As any other transport phenomena taking place between different phases, oxygen transfer rate is deeply influenced by the hydrodynamic conditions in the bioreactor that can affect the mass transfer coefficient and the interfacial area. Therefore, variations in configuration of bioreactor and the physicochemical properties of the culture medium, such as density, diffusivity, rheological properties, and surface tension can hinder the oxygen transfer capacity and lead to oxygen depletion [11].

Another factor that affects the lipase production is the nutritional composition of media, because these enzymes are generally produced over

lipidic carbon sources, such as oils, fatty acids, or glycerol in the presence of an organic nitrogen source [12]. Glycerol can be used as carbon source in microbial bioconversions for the production of a range of chemicals that could be used either as end-products or as precursors for the production of other chemicals. Although there are limited researches concerning the utilization of glycerol in microbial bioconversions, there is a quite broad range of products that could be produced [13]. More important yet is the fact that glycerol is a by-product of biodiesel synthesis and since this biofuel will be produced in a large scale in the next years, high amounts of glycerol will be discarded and can be used in bioprocesses. In a previous work we showed that glycerol was better than glucose for growth and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. It was also reported that the cultivation using raw glycerol obtained by enzymatic synthesis of biodiesel, showed to be possible the use of this abundant, cheap, and surplus by-product of biodiesel synthesis for lipase production by this strain [14]. This is extremely important for the economic feasibility of biotechnological processes and a future integration of lipase production and biodiesel synthesis.

In this present work we studied the kinetics of lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17 concerning different conditions of oxygen transfer rates and medium pH, using glycerol as carbon source. These were chosen because choice of an appropriate culture pH and oxygen transfer is crucial due to the strong influence of these variables in culture yields and operating costs.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism, cultures maintenance and inoculum preparation

A strain of *Staphylococcus warneri* isolated by us from an abattoir fat-rich wastewater was used. This strain was identified by 16S rDNA gene sequencing and named EX17. Cells were kept at 4 °C on tributyrin agar plate containing, in g/L: peptone, 5; yeast extract, 3; tributyrin, 10. Inoculum was prepared in 125 mL Erlenmeyer flasks filled with 25 mL of LB medium and inoculated with a loop from a stock culture. Cells were cultivated at 150 rpm, 37 °C for 18 h. After this procedure, 2 mL of preinoculum was inoculated into 100 mL LB medium and

grown to an optical density (OD) of 1.0. This was the inoculum for the bioreactor cultivations. This procedure was used as the standard inoculum preparation for all experiments.

2.2. Bioreactor cultures

Batch cultivations were carried in a 2 L working volume stirred bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) filled with 2 L of medium. The bioreactor was equipped with temperature, agitation, aeration and pH controllers and two Rushton turbines with six flat-blades. The culture medium was optimized in a previous study [14] and contained, in g/L: peptone, 10; raw yeast extract (autolysed unpurified yeast extract, Prodesa, Brazil), 5; glycerol, 30; olive oil, 6 and soybean oil, 5. The medium was sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 min. Media were emulsified in a blender at maximum speed for 30 s. The optimized temperature was 37 °C. The influence of pH of the culture media was studied as either uncontrolled (initial pH 8.0) or controlled at 6.0, 7.0, or 8.0, respectively. Dissolved oxygen concentration in the culture was measured using a polarographic electrode and was expressed as percentage of O₂ saturation. The oxygen transfer rate was studied as the oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_{La}). The estimation of k_{La} was carried out by the dynamic gassing-out method [15]. The agitation and aeration rates were set at different values, characterizing four different oxygen transfer conditions: 26 h⁻¹ (400 rpm, 4 vvm); 38 h⁻¹ (600 rpm, 4 vvm); 50 h⁻¹ (600 rpm, 5 vvm) and 83 h⁻¹ (600 rpm, 6 vvm).

Samples were taken along the cultivation to determine lipolytic and proteolytic activities, biomass, and glycerol concentration. All experiments were carried out in duplicates.

2.3. Analytical methods

The cell-free supernatant of the culture medium, referred as the crude enzyme extract, was used for the estimation of enzyme activities and for glycerol concentration determinations.

Lipolytic activity was determined using p-nitrophenyl palmitate (pNPP) as the substrate [16]. A volume of 0.15 mL of crude enzyme extract was mixed with 1.35 mL of the prepared substrate solution and incubated at 37 °C for 15 min in water bath. Control containing heat-inactivated enzyme was also incubated for each assay. The mixture was centrifuged (14,000 g, 10 min, 10 °C) and the reaction was measured as absorbance at 410 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme that liberated 1 µmol p-nitrophenol per min at 37 °C. Under these conditions the extinction coefficient of p-nitrophenol is $13.23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Proteolytic activity was measured by the azocasein method, according to Sarath et al. [17]. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to produce the change in one unit of absorbance under the conditions of the method.

Biomass was quantified gravimetrically as cell dry weight. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried at 80 °C to a constant weight. Glycerol concentration was determined by HPLC with a refractive index (RI) detector (Perkin Elmer Series 200, USA) and a Phenomenex RHM monosaccharide column (300 x 7.8 mm), at 80 °C, using ultrapure water as eluent, flow of 0.6 mL/min and sample volume of 20 µL.

2.4. Luedeking and Piret Model

Microbial cultivations can be analyzed by kinetic models, which can provide some insight for designing and operating the bioreactor. The model of Luedeking and Piret [18] has been widely employed to correlate the production rate with cell growth (Eq. 1 and 2):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1)$$

or

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (2)$$

where P is lipolytic activity, X is cell density, t is time, μ is the specific growth rate, q_p is the specific rate of lipase formation, and α and β are constants. Eq.

(1) is a model describing the formation of a mixed-growth-associated product. If $\beta = 0$, the product is growth-associated, while for $\alpha = 0$, the product is non-growth-associated.

3. Results and discussion

In a previous work [14], we showed the ability of one strain of *Staphylococcus warneri* isolate EX17 to produce lipolytic activity in submerged cultivation. The culture conditions were optimized in an orbital shaker, and the maximum lipolytic activity of 140 U/L was obtained at the end of the exponential phase, in an uncontrolled pH culture (initial pH = 8.0). In the present research, we present the scaling-up of the process to bioreactor, studying the process variables oxygen transfer rates, pH and glycerol as carbon source over enzyme production.

3.1. Influence of pH

Staphylococcus warneri EX17 was cultivated in a 2 L batch bioreactor. Firstly, we studied different conditions of pH either as uncontrolled (initial pH = 8.0) or controlled throughout cultivation at 6.0, 7.0, or 8.0. The Figs. 1a and 1b show the time course of biomass and lipolytic activity, respectively, for the cultures on different conditions of pH. Exponential growth kinetics were observed (Fig. 1a) and the highest biomass production was obtained with controlled pH at 7.0, approximately 10 fold of that in cultures at controlled pH 8.0. When the cultivation was carried out under uncontrolled pH (initial pH = 8.0), biomass formation was higher than the culture at controlled pH 8.0, probably due to a decrease of the pH caused by cellular growth, and thus the pH stayed by a period in the range around 7.0. The lipolytic activity (Fig. 1b) was approximately 800 U/L at 12 h of cultivation with controlled pH at 7.0, which was almost 10 fold higher than that for controlled pH at 8.0 (92 U/L), and five fold of that for uncontrolled pH (150 U/L).

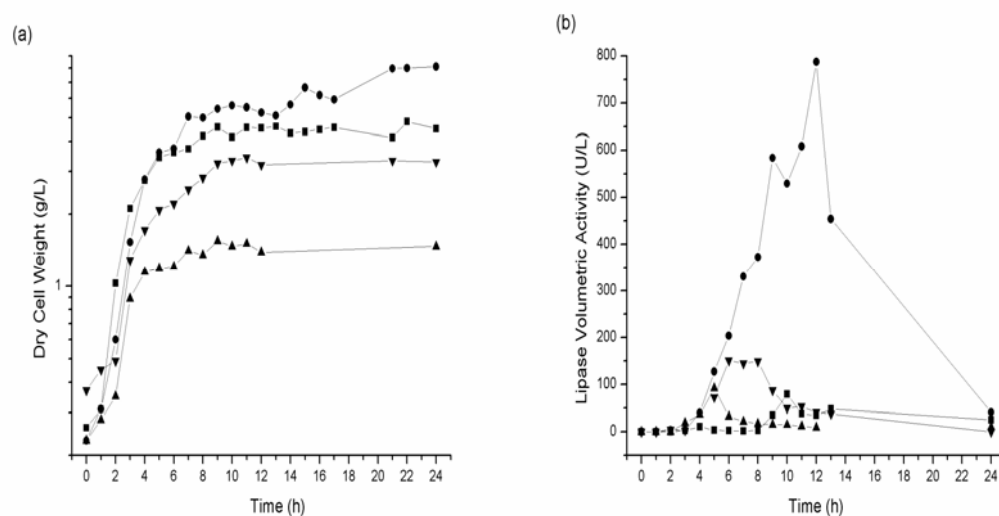


Figure 1 - Influence of pH in the cultivation of *S. warneri* EX17 under oxygen transfer rate of 38 h^{-1} . (a) cell growth and (b) lipase volumetric activity. Plot of pH 6.0 (■); pH 7.0 (●); pH 8.0 (▲); uncontrolled pH (▼).

These results indicate that pH is an important factor for *S. warneri* growth and lipase production. Therefore, all subsequent experiments were carried out controlling pH at 7.0. Notwithstanding, very few works have explored the influence of pH on lipase production. Controlled pH was used by Fickers et al. [19] for lipase production by *Yarrowia lipolytica* (pH 6.5) in bioreactor, and by Chen et al. [7] for cultivations of *Acinetobacter radioresistens* at pH 7.0, but most of literature reports lipase production under uncontrolled pH [5,9,20-22].

The rapid pH decrease in the first hours of cultivations may lead to enzyme inactivation as most lipases from bacteria below pH 5.0 [14,23-26].

3.2. Influence of oxygen transfer

The time course of cell growth, glycerol consumption, and lipase production by *S. warneri* EX17 at k_{La} of 26 h^{-1} are depicted in Fig. 2. Under these conditions the biomass and the lipolytic enzyme production were similar to previous results obtained in shake flask. However, the incubation time required for maximum lipase specific activity was reduced from 24 to only 6 h of cultivation. There was two times increase in cell concentration as compared to the shake flask experiments, from 3.0 to 6.0 g/L. Similar profiles were obtained

by Gupta et al. [27], who showed that *Burkholderia multivorans* had a peak of lipase production reduced from 36 h to 15 h of cultivation when scaling up from shake to bioreactor, while biomass increased five times.

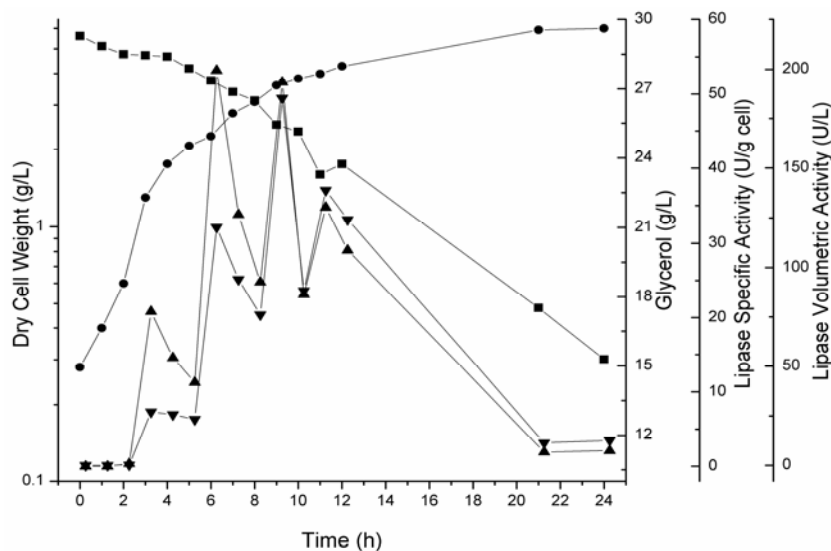


Figure 2 - Cultivation of *S. warneri* EX17 under oxygen transfer rate of 26 h^{-1} , with controlled pH = 7.0. Plot of cell mass (●); glycerol (■); lipase specific activity (▲); lipase volumetric activity (▼).

The increase in oxygen transfer coefficient from 26 to 38 h^{-1} (Fig. 3) resulted in an improved lipase volumetric production by approximately four times, while specific activity increased by approximately three times, and the biomass increased from 6.0 g/L to 8.0 g/L . This condition (k_{La} of 26 h^{-1}) appears to be oxygen limiting, impairing cell growth and lipase production. These findings are in agreement with the results reported by Alonso et al. [22] that obtained five times increase in lipase production by *Yarrowia lipolytica* when culture k_{La} was increased from 8.5 h^{-1} to 12.2 h^{-1} .

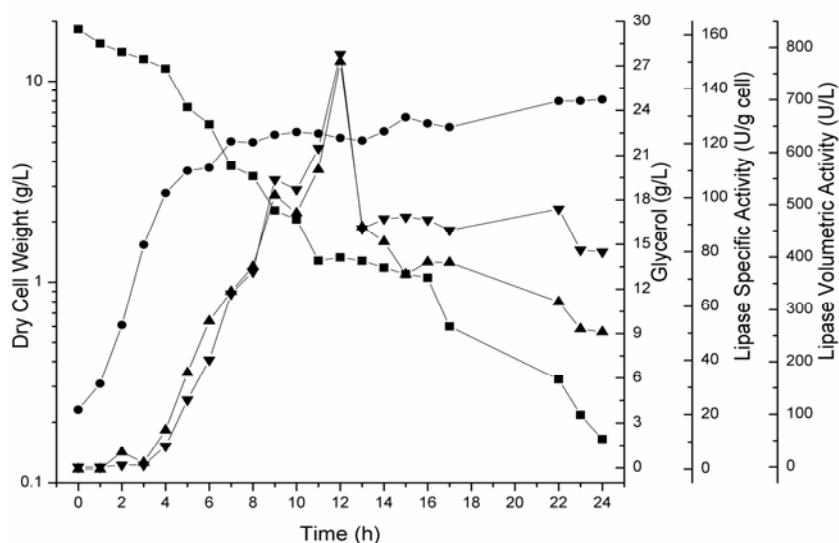


Figure 3 - Cultivation of *S. warneri* EX17 under oxygen transfer rate of 38 h^{-1} , with controlled pH = 7.0. Plot of cell mass (●); glycerol (■); lipase specific activity (▲); lipase volumetric activity (▼).

Kinetic profiles of cell growth, glycerol consumption, and lipase production by *S. warneri* EX17 at k_{La} of 50 h^{-1} and 83 h^{-1} are depicted in Fig. 4 and 5, respectively. Increases in k_{La} to 50 h^{-1} and 83 h^{-1} , resulted in a decrease in biomass concentrations (6.5 g/L and 7.4 g/L , respectively), when compared with condition of k_{La} of 38 h^{-1} , probably caused by the toxic effect of oxygen. It is known that an excess of dissolved oxygen may cause a limitation of cell growth and, consequently, lipase production [28]. Similar behaviour were reported for *Candida rugosa* growing in bioreactor at different conditions of aeration rate, when the highest cell concentration (6.0 g/L) and lipase production ($1,800 \text{ U/L}$) were obtained for aeration rates of 3.0 L air/min , with sharp decrease for both when aeration rate was up to 4.0 L air/min [29]. Dominguez et al. [9] reported the lipase production in bioreactor by *Thermus thermophilus* HB27 at different air flow conditions ($0, 0.5, 1.0, 1.5$ and 2.5 L air/min), and obtained the highest intracellular lipase production (120 U/L) for 1.5 L air/min , and the highest extracellular lipase production (60 U/L) for 1.0 L air/min . However, for *Rhizopus arrhizus*, Elibol and Ozer [5] showed that the

increase of dissolved oxygen, increased both the biomass concentration and lipase production. Fuciños et al. [20] observed a similar behavior of lipase production by *Thermus thermophilus* and *Thermus aquaticus*. These authors verified that increasing the aeration rate of cultures of *T. thermophilus*, the production of biomass and, particularly, intracellular lipolytic activity increased likewise. They observed maximum extracellular lipolytic activity of 18 U/L for *T. thermophilus* and 33 U/L for *T. aquaticus*, and highest intracellular lipolytic activity of 80 U/L and 70 U/L, respectively. It is possible to speculate that these differences are a consequence of morphophysiological variability between the microorganisms, reflecting different oxygen requirements for maintenance of their physiological functions or their influence on rheological properties of culture media [22].

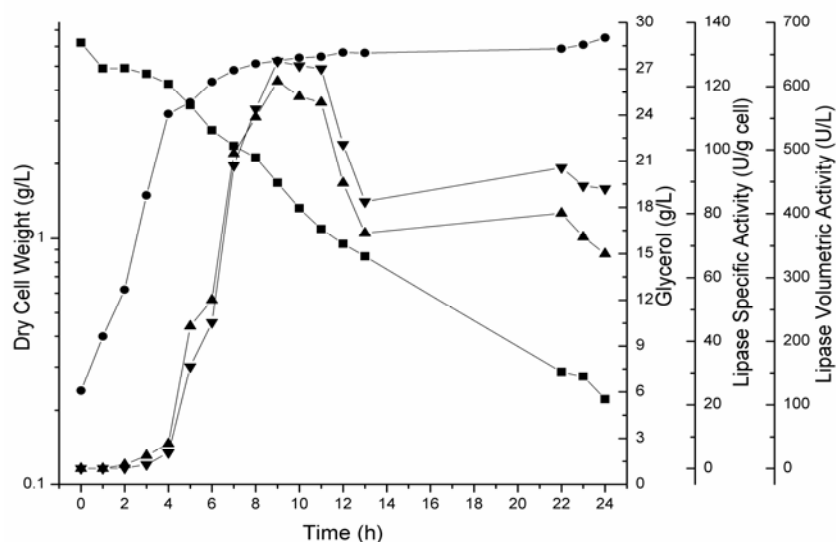


Figure 4 - Cultivation of *S. warneri* EX17 under oxygen transfer rate of 50 h^{-1} , with controlled pH = 7.0. Plot of cell mass (●); glycerol (■); lipase specific activity (▲); lipase volumetric activity (▼).

The results obtained showed that lipase production by *S. warneri* was limited by oxygen supply. For cultures with $k_{L,a}$ of 26 h^{-1} and 38 h^{-1} the dissolved oxygen quickly decreased reaching zero in 3 and 5 h of the cultivation, respectively. In the culture of $k_{L,a}$ of 50 h^{-1} , the dissolved oxygen concentration

quickly decreased in the first 4 hours and stabilized around 3.5 mgO₂/L until the end of run, while for k_{La} of 83 h⁻¹, the dissolved oxygen stayed above 5.0 mgO₂/L, suggesting a possible toxic effect by excess of oxygen. In order to check for proteolysis of lipases, the batches were evaluated for the protease content of the medium and their highest proteolytic activities at the different k_{La} values were: 2.79 U/mL for 26 h⁻¹; 32.45 U/mL for 38 h⁻¹; 3.58 U/mL for 50 h⁻¹; and 2.33 U/mL for 83 h⁻¹. These were very close results and the highest value for proteases was obtained for conditions that produced the highest lipolytic activities. Therefore, we can rule out any impact of proteolysis of lipases.

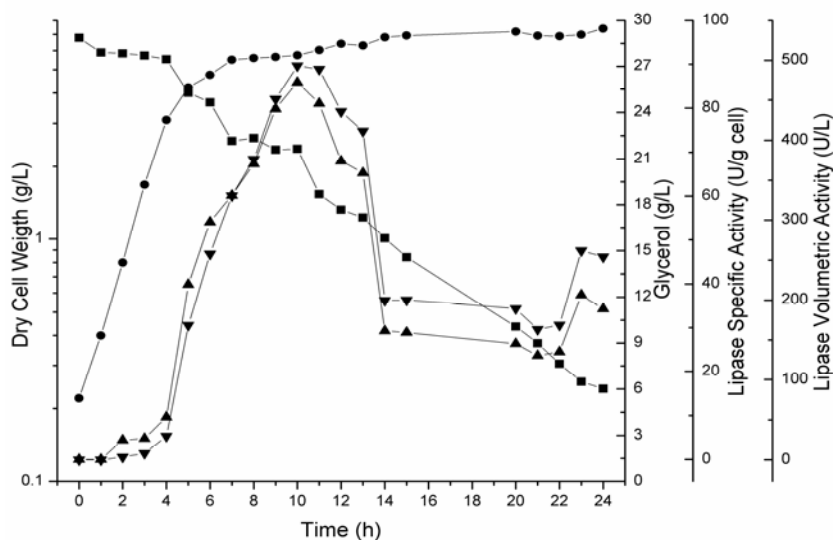


Figure 5 - Cultivation of *S. warneri* EX17 under oxygen transfer rate of 83 h⁻¹, with controlled pH = 7.0. Plot of cell mass (●); glycerol (■); lipase specific activity (▲); lipase volumetric activity (▼).

We also observed that the lipase production was partially growth-associated. This result suggests that the cell produces lipases in order to obtain the energy required to form new cells from the available carbon sources, and at the same time it does so as a normal metabolic activity irrespective of growth, that can be confirmed by glycerol consumption profiles (Fig. 2-5). We correlated the enzyme production rate with cell growth using the Luedeking-Piret model described in Eq. (1). The plot of q_p versus μ is shown in Fig. 6. As can be seen,

the data on lipase production could be described by the mixed model, and the model obtained was:

$$q_p \text{ (U/g cell.h)} = 33.02 \mu \text{ (h}^{-1}\text{)} + 2.20 \quad (3)$$

From Eq. (3), it can be seen that the lipase production rate for *Staphylococcus warneri* EX17 shows a linear relationship with the specific cell growth rate ($R^2 = 0.95$). Results confirm that the biosynthesis of lipase is partially growth-associated, which agrees with findings for other microorganisms [5,7,29].

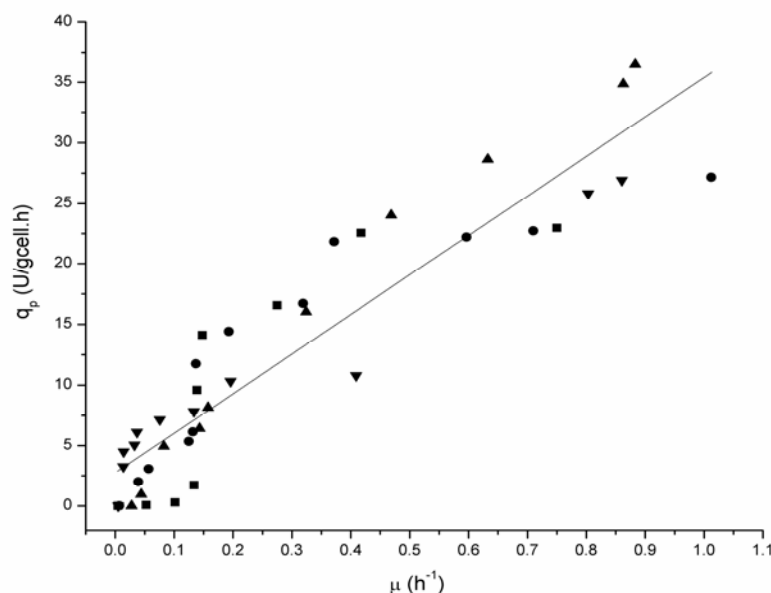


Figure 6 - Description of *S. warneri* EX17 lipase production by Luedeking-Piret model. Values of k_{La} : (■) 26 h^{-1} ; (●) 38 h^{-1} ; (▲) 50 h^{-1} ; (▼) 83 h^{-1} .

Table 1 summarizes the major process parameters when different k_{La} values were employed. The μ_{max} value was found to be highest at k_{La} of 38 h^{-1} (0.75 h^{-1}), demonstrating again that this k_{La} value was favorable for growth compared to the others k_{La} values. At this k_{La} the biomass productivity, consumed substrate and lipase productivity were the highest. The maximum volumetric lipolytic activity and specific lipolytic activity occurred in k_{La} of 38 h^{-1} in 12 h of cultivation.

Table 1 - Influence of k_{La} on cultivation parameters of growing and lipase production by *S. warneri* EX17

Parameter	Oxygen transfer coefficient (h^{-1})			
	26	38	50	83
μ_{max}^a (h^{-1})	0.59	0.75	0.71	0.68
q_x^b (g/L.h)	0.36	0.69	0.66	0.67
q_s^c (g/L.h)	0.79	1.33	1.10	0.91
q_p^d (U/g cell.h)	22.96	27.16	36.48	26.91
Maxima specific lipolytic activity (U/g cell)	51.6	150.1	121.6	85.8

^aMaximum growth rate; ^bbiomass productivity; ^csubstrate consumed; ^dlipase productivity.

4. Conclusions

The present study reports the biotechnological potential of lipase production in bioreactor by *S. warneri* EX17, a strain recently isolated from abattoirs wastewater treatment plants and never studied before. We showed the importance of k_{La} in order to maximize cell growth and lipase production for this bacterium and that oxygen supply was a key factor controlling the bioconversion of glycerol into biomass and enzyme. The use of glycerol as the sole carbon source for lipase production is extremely important for the new generation of biotechnology products such as biodiesel, since this substrate is going to be produced in very large amounts as by-product and, therefore, its integration in process will have great impact on cost reduction. Under the best condition of k_{La} , lipase production was five times higher than previously observed in shaking flask cultivations and glycerol proved to be better than other commonly used carbon sources as glucose, for instance. Further studies are granted to scale-up the process to obtain this biocatalyst reducing the costs of production and its industrial applications, such as in the biodiesel synthesis.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES and CNPq for scholarships and financial support for this research.

References

1. Ul-Haq, I., S. Idrees, and M. I. Rajoka (2002) Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. *Process Biochem.* 37: 637-641.
2. Hasan, F., A. Ali Shah, and A. Hameed (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39: 235-251.
3. Gupta, R., N. Gupta, and P. Rathi (2004) Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 763-781.
4. Murty, R. V., J. Bhat, and P. K. A. Muniswaran (2002) Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2:57-66.
5. Elibol, M., and D. Ozer (2000) Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochem.* 36: 325-329.
6. Sharma, R., Y. Chisti, and U. C. Banerjee (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.
7. Chen, J. Y., C. M. Wen, and T. L. Chen (1999) Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 311-316.
8. Amaral, P. F. F., A. P. R. Almeida, T. Peixoto, M. H. M. Rocha-Leão, J. A. P. Coutinho, and M. A. S. Coelho (2007) Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 339-344.
9. Dominguez, A., L. Pastrana, M. A. Longo, M. L. Rúa, and M. A. Sanroman (2005) Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 26: 95-99.

10. Galaction, A. I., D. Cascaval, C. Oniscu, and M. Turnea (2004) Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochem. Eng. J.* 20: 85-94.
11. Garcia-Ochoa, F., and E. Gomez (2005) Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 92: 761-772.
12. Jaeger, K. E., and T. Eggert (2002) Lipases for biotechnology. *Curr. Opinion Chem. Biotechnol.* 13: 390-397.
13. Koutinas, A. A., R. H. Wang, and C. Webb (2007) The biochemurgist – Bioconversion of agricultural raw materials for chemical production. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1: 24–38.
14. Volpato, G., R. C. Rodrigues, J. X. Heck, and M. A. Z. Ayub (2008) Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83: 821-828.
15. Pouliot, K., J. Thibault, A. Garnier, and G. A. Leiva (2000) K_La evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques. *Bioprocess Eng.* 23: 565-573.
16. Winkler, U. K., and M. Stuckmann (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 138: 663-670.
17. Sarath, G., R. S. Motte, and F. W. Wagner (1989) Proteolytics assay methods. In: Beyon R.J., Bond J.S. (eds). *Proteolytic enzymes: a practical approach*. p. 22-55. IRL, Oxford.
18. Luedeking, R., and E. L. Piret (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol Eng.* 4: 231-241.

19. Fickers, P., M. Ongena, J. Destain, F. Weekers, and P. Thonart (2006) Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme Microb. Technol.* 38: 756-759.
20. Fuciños, P., A. Domínguez, M. A. Sanromán, M. A. Longo, M. L. Rúa, and L. Pastrana (2005) Production of thermostable lipolytic activity by *Thermus* species. *Biotechnol. Prog.*; 21: 1198-1205.
21. Fuciños, P., C. M. Abadín, A. Sanromán, M. A. Longo, L. Pastrana, and M. L. Rúa (2005) Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB 27: partial purification and preliminary biochemical characterization. *J. Biotechnol.* 117: 233-241.
22. Alonso, F. O. M., E. B. L. Oliveira, G. M. Dellamora-Ortiz, and F. V. Pereira-Meirelles (2005) Improvement of lipase production at different stirring speeds and oxygen levels. *Brazilian J. Chem. Eng.* 22: 9-18.
23. Nawani, N., and J. Kaur (2007) Studies on lipolytic enzymes from a thermophilic *Bacillus* sp.: Production, purification and biochemical characterization. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 881-887.
24. Sharma, R., S. K. Soni, R. M. Vohra, L. K. Gupta, and J. K. Gupta (2002) Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem.* 37: 1075-1084.
25. Pratuangdejkul, J., and S. Dharmsthiti (2000) Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiological Research* 155: 95-100.
26. Abramic, M., I. Lescic, T. Korica, L. Vitale, W. Saenger, and J. Pigac (1999) Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 522-529.
27. Gupta, N., V. Sahai, and R. Gupta (2007) Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochem.* 42:518-526.

28. Sokolovská, I., C. Albasi, J. P. Riba, and V. Báles (1998) Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330. *Bioprocess Eng.* 19: 179-186.
29. Puthli, M. S., V. K. Rathod, and A. B. Pandit (2006) Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 27: 287-294.

**Capítulo IV - PURIFICATION AND HYPERACTIVATION OF A
LIPASE FROM *Staphylococcus warneri* EX17**

Artigo enviado para publicação no periódico: *Process Biochemistry*, em novembro de 2008.

Purification and hyperactivation of a lipase from *Staphylococcus warneri*
EX17

Giandra Volpato^{1,2}, Marco Filice¹, Blanca de las Rivas¹, Rafael C. Rodrigues^{1,2},
Júlio X. Heck³, Roberto Fernandez-Lafuente¹, Jose M. Guisan¹, Cesar
Mateo^{1#}, and Marco Antônio Záchia Ayub^{2*}

¹Departamento de Biocatálisis. Instituto de Catálisis-CSIC. Campus UAM. Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain.

² Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Technical School, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Ramiro Barcelos, 2777, ZC 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Dr Marco Antônio Záchia Ayub

E-mail: mazayub@ufrgs.br; Phone: + 55 (51) 33086685 ; Fax: +55 (51) 33087048

Co-corresponding author: Prof. Dr Cesar Mateo

E-mail: ce.mateo@icp.csic.es; Phone: +34 915854760; Fax: +34 915854809

Purification and hyperactivation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17

Abstract

An extracellular lipase produced by *Staphylococcus warneri* strain EX17 (SWL) has been purified by one chromatographic step based on the interfacial activation of the lipase on hydrophobic supports at low ionic strength. The adsorption of the enzyme on octyl-Sepharose enhanced enzyme activity by 60 %. A purification factor of approximately 10 could be obtained by using octyl-Sepharose, but still some other proteins would become adsorbed on this support. However, with butyl-Toyopearl, a less hydrophobic support, the purification factor was close to 20, and the only band of protein detected on SDS-PAGE was SWL. The lipase could be easily desorbed from the support by incubation in the presence of Triton X-100, yielding a purified enzyme. SWL was immobilized under very mild conditions on cyanogen bromide sepharose to produce an immobilized enzyme showing similar activities and stability to the soluble form of it. This immobilized enzyme could be hyperactivated by a factor of 2.5 with 0.1% (v/v) Triton X-100 or by a factor of 1.3 with 0.01% Tween 80, while ionic detergents producing detrimental effects on the enzyme activity even at very low concentrations.

Key words: *Staphylococcus warneri*, lipase, enzyme purification, enzyme hyperactivation, hydrophobic immobilization supports, interfacial activation.

1. Introduction

Lipases are among the most widely used enzymes in biocatalysis due to their very broad range of substrates, very often with a high regio or enantioselectivity [1, 2]. The broad diversity of uses for lipases makes attractive the search for new microorganisms producers of these enzymes with different specificities, stabilities, and so on. *Staphylococcus warneri* has been described as a very interesting lipase producer, with four different lipases described and deposited in the protein databases (accession numbers BAD90560, BAD90561, BAD90562, BAD90565). In addition, for *S. warneri* 863 strain, two lipases, SWL1 and SWL2, have already been purified and partially characterized [3, 4], being SWL2 96 % identical to the protein deposited under accession number BAD90565.

Lipases have a very peculiar mechanism of action, called interfacial activation [5, 6]. In homogenous aqueous medium, the active centre of most lipases is secluded from the reaction medium by a polypeptide chain, called flap or lid. This form is in equilibrium with the lipase open structure, where the lid is displaced exposing the active centre to the medium. In the presence of hydrophobic surfaces, such as drops of oils [6], the lipase open form becomes adsorbed, involving the large hydrophobic surface formed by the hydrophobic areas of the inner side of the lid and the surroundings of the active centre [7, 8]. This peculiar mechanism of action has allowed developing a specific purification protocol for lipases [9]. The open form of lipases become adsorbed on any hydrophobic surfaces such as hydrophobic supports [10], hydrophobic proteins [11] or other open forms of lipases [12] even at low ionic strength. Under these mild conditions, is very difficult to water soluble proteins to become adsorbed on these hydrophobic surfaces. The adsorption of lipases on the hydrophobic supports may be easily controlled by using supports with different hydrophobicity [13] improving purification or even allowing for separating different lipase forms from a protein extract [14]. The adsorbed lipases may be easily desorbed from the support by incubation with detergent solutions [13].

In this paper, we partially purified and characterized an extracellular lipase from *S. warneri* strain EX17. We also describe the adsorption of crude

protein extracts from *Staphylococcus warneri*, strain EX17 grown under conditions of lipase induction [15]. We tested the adsorption of the crude protein extract in different hydrophobic supports aiming at obtaining a purified lipase, and to check the effects of detergents on the activity of this purified lipase covalently immobilized under mild conditions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Ethanolamine hydrochloride, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), and *p*-nitrophenyl butyrate (p-NPB) were from Sigma. 1,4-Dioxane was from Fluka. Octyl-Sepharose CL-4B and cyanogen bromide activated Sepharose 4B (CNBr) were from GE Healthcare. Butyl-Toyopearl 650M was from Tosoh Corporation. Other reagents and solvents used were of analytical or HPLC grade.

2.2. Methods

2.2.1. *Staphylococcus warneri* EX17 lipase (SWL) production

A microorganism isolated from an abattoir fat-rich wastewater in Brazil, and recently identified as *Staphylococcus warneri* EX17, [16] was kept at 4°C on tributyrin agar plate containing, in g/L: peptone, 5; yeast extract, 3; tributyrin, 10. Inoculum was prepared in 125 mL Erlenmeyer flasks filled with 25 mL of LB medium and inoculated with a loop from a stock culture. Cells were cultivated at 150 rpm, 37 °C for 18 h. After this procedure, 2 mL of pre-inoculum was inoculated into 100 mL LB medium and grown to an optical density (OD) of 1.0. Batch cultivations were carried in a 5 L working volume stirred bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) filled with 4 L of medium. The culture medium and bioreactor conditions were optimized in previous studies to produce the extracellular lipase [15, 16]. The culture medium contained, in g/L: peptone, 10; raw yeast extract, 5; glycerol, 30; olive oil, 6 and soybean oil, 5. The cultures were carried out under agitation speed and air flow rate to produce a oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) of 38 h⁻¹ at mid-log phase, controlled pH at 7 and 37 °C.

The culture broth was centrifuged (3,000 g for 20 min at 4 °C) to recover the supernatant, and this was clarified by washing with n-hexane (1:1 v/v) to remove oils contained in the culture medium. The aqueous phase, called crude protein extract, was used for further studies.

2.2.2. Lipase activity assay

This assay was performed by measuring the increase in the absorbance at 348 nm produced by the release of *p*-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM pNPB in 25 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C, using a thermostated spectrum with continuous magnetic stirring. To start the reaction, 0.05 mL of lipase solution or suspension was added to 2.5 mL of substrate solution. In some instances, detergents were added to the reaction mixtures. One unit (U) of pNPB activity was defined as the amount of enzyme necessary to hydrolyze 1 μ mol of pNPB/min under the conditions above described.

2.2.3. Purification of SWL

Interfacial activation against hydrophobic supports was the used technique for enzyme purification [10]. The crude SW protein extract was diluted with sodium phosphate at pH 7.0 to obtain a final concentration of 10 mM. Then, octyl-Sepharose beads or butyl-Toyopearl were added to the mixture, which was maintained under continuous stirring. Periodically, the activities of suspensions and supernatants were measured by the pNPB assay. Following this reaction, the support with the adsorbed proteins was vacuum filtered using a sintered glass funnel and abundantly washed with distilled water. SWL was desorbed from the hydrophobic supports by suspending the immobilized enzyme in a 1:10 (w/v) ratio in 25 mM sodium phosphate at pH 7.0 at 4 °C containing different concentrations of Triton X-100.

2.2.4. Immobilization of SWL on CNBr-Activated Support

Purified SWL was immobilized on CNBr-activated support at 4 °C and pH 7, for 15 min to reduce the possibilities of multipoint covalent attachments between enzyme and the support. The enzyme-support reaction was stopped

by incubating the support with 1 M ethanolamine at pH 8 for 2 h. During the immobilization and further blocking of the support, the suspension was submitted to continuous gentle stirring. Finally, the immobilized SWL preparation was vacuum filtered using a sintered glass funnel and washed with abundant water to eliminate the detergent. This immobilized enzyme was called CNBr-SWL.

2.2.5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis analysis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE electrophoresis was performed according to the method described by Laemli [17] in a SE 250-Mighty Small II electrophoretic unit (Hoefer Co.) using gels of 14 % polyacrylamide in a separation zone of 9 cm × 6 cm and a concentration zone of 5 % polyacrylamide. The gels were silver stained [18]. Molecular mass markers were the LMW kit (Mr) (14,400–94,000) from Pharmacia.

3. Results

3.1. Adsorption of SWL on different hydrophobic supports

Figure 1 shows the adsorption courses of SWL on butyl-Toyopearl and octyl-Sepharose. In both cases, the adsorption is very fast, with the enzyme fully immobilized on the support after only 30 min. Using octyl-agarose, the activity of the immobilized enzyme increased by a factor of 1.6, while using butyl-Toyopearl the enzyme activity remained almost unaltered. This full adsorption of the lipase on octyl-agarose at low ionic strength and the increment of activity due to this adsorption are in agreement with previous reports using other lipases that suggested that the enzyme became immobilized on this support via its interfacial activation on the support, therefore stabilizing its open form [10]. Although expected that the adsorption mechanism using butyl-Toyopearl should be similar to that compared with octyl-agarose this adsorption did not produced any effects on the enzyme activity.

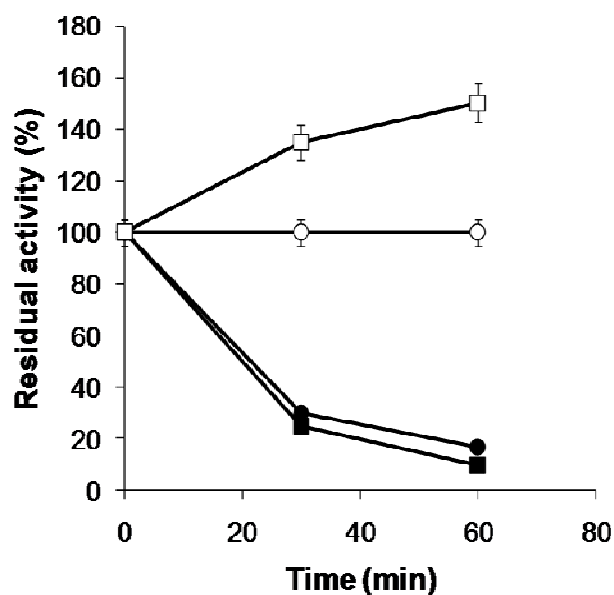


Figure 1 - Adsorption courses of SWL on butyl Toyopearl (circles) or octyl-Sepharose supports (squares). Closed symbols: supernatants; open symbols: suspensions. Results are the mean of three experiments.

The adsorbed enzyme could be desorbed from the support by incubation in the presence of detergent solutions (e.g., Triton X-100) and the results are shown in Figure 2. The concentration of detergent to fully desorb SWL from butyl-Toyopearl was higher than that necessary to desorb the enzyme from octyl-Sepharose.

Both results could be due to the different internal morphology of the support. Agarose is formed by moderately thick trunks of agarose polymers [19] that reduce the geometrical congruence between the enzyme active center and the support, and therefore reducing the blockage of the active center of the enzyme after enzyme adsorption by the surroundings of the active center. Toyopearl is formed by fine fibres that permit a higher geometrical congruence between the pocket formed by active center surroundings and the support, promoting a more significant blockage of the enzyme active center by the support [20].

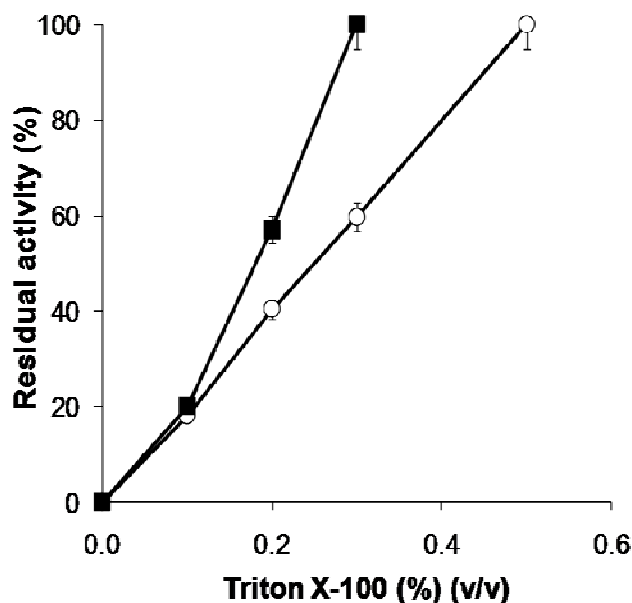


Figure 2 - Desorption of SWL adsorbed on octyl-Sepharose (■) or butyl-Toyopearl (○). Figure shows the percentage of activity in the supernatant. Results are the mean of three experiments.

3.2. Purification of SWL

The purification of SWL was tested by adsorption using both supports followed by desorption through incubation in the presence of detergents. Table 1 shows the results of SWL purification. Purification yields were in both cases near 100 %. Using octyl-Sepharose, the purification factor was close to 10, while using butyl-Toyopearl the obtained purification factor was almost 20.

Table 1 - Summary of the parameters during the purification of lipase from *S. warneri* EX17. Specific activity is given after enzyme desorption

Steps	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Purification yield (%)
Crude extract	15.4	59.3	0.26	1.0	100
Octyl-Sepharose	15.0	5.8	2.4	9.2	97
Butyl-Toyopearl	14.8	3.0	4.9	18.7	96

Figure 3 shows the SDS-PAGE gel of the adsorbed proteins on octyl-Sepharose and butyl-Toyopearl supports. In both cases, most of the proteins from the crude protein solution were not adsorbed on the support. However, 3 protein bands additionally to the SWL band could be observed using octyl-Sepharose, showing that even under these mild conditions other proteins could at least partially be adsorbed on octyl-Sepharose. Using butyl-Toyoperal, a less hydrophobic support, the only visible band was that from SWL, with a molecular weight of approximately 40 kDa. Therefore, to purify SWL, the proposed protocol was defined as an incubation of the *S. warneri* crude extract in the presence of butyl-Toyopearl for 30 minutes, followed by an incubation of the previous support in the presence of 0.5% (v/v) Triton X-100 to desorb the enzyme.

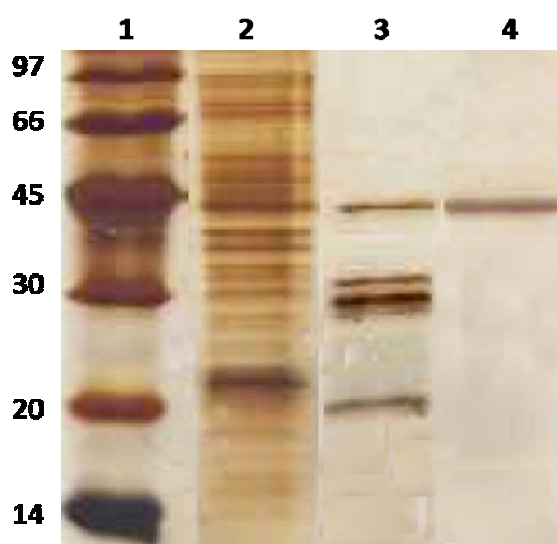


Figure 3 - SDS-PAGE analysis of the SWL purification. Lane 1: molecular weight markers (kDa); lane 2: crude extract of *S. warneri* EX17; lane 3: proteins adsorbed on octyl-Sepharose; lane 4: proteins adsorbed on butyl-Toyopearl.

Experiments were performed as described in methods.

3.3. Immobilization on CNBr

In the study of lipases, lipase-lipase interactions can impair activity, stability and even selectivity [21]. To ensure the existence of only lipase monomers, it is convenient the use low concentrations of protein and detergents, although this procedure could also alter the enzyme properties. One

alternative to study the monomeric form of lipases is to prepare an immobilized enzyme derivative in the presence of detergents to have lipase monomers, using very short times of reaction and low immobilization temperatures, in order to limit the enzyme-support interactions, afterwards eliminating the detergent. This technique can produce an immobilized enzyme system with properties very similar to those of the soluble enzymes. Therefore, SWL was immobilized on CNBr under very mild conditions as described in methods and results are shown in Figure 4a. The immobilized enzyme maintained 100% of its activity. The immobilized enzyme stability was identical to that of the soluble enzyme when exposed to 60 °C, at pH 7 (Figure 4b). Thus, this immobilized enzyme system, with activities and thermostabilities identical to those of the soluble enzyme, seems to be a good model in order to study the properties of the soluble enzyme in the absence of any intermolecular phenomena.

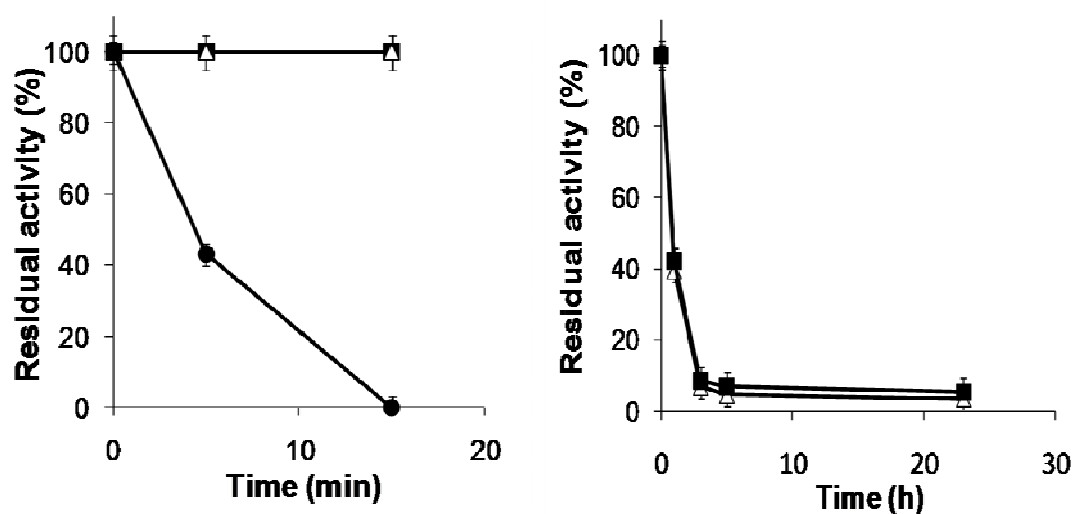


Figure 4 - (a) Immobilization course of SWL on CNBr-Sepharose. Immobilization was performed at pH 7 and 4 °C. (■) control; (△) immobilization suspension; (●) supernatant of the immobilization suspension. (b) Inactivation courses at 60 °C in 25 mM sodium phosphate pH 7 of (■) Soluble-SWL, and (△) CNBr-SWL. Results are the mean of three experiments.

3.4. *Effect of detergents on SWL activity*

Detergents have been described to exert a complex effect on lipases [22-24]. For instance, they can stabilize the open form of lipases, increasing their activity, but they also have presented some negative effects on the lipase stability. Moreover, detergents use to act as competitive inhibitors [25]. Furthermore, detergents have been proposed as a simple way to modulate the enzyme selectivity [23]. Thus, detergents may be a useful way to improve SWL properties. The effect of detergents in the activity of this SWL mildly immobilized in CNBr beads has been studied in this research. Figure 5 shows the effect of the Triton X-100, CTAB, Tween 80 and SDS on the enzyme activity. Triton X-100 increased SWL activity, with a maximal of 260 % at 0.1% (v/v), with higher concentrations producing some decrements in enzyme activity compared to this maximal, but still higher activity than the enzyme in the absence of detergent was detected. The effects of other detergents were not as positive on enzyme activity. Tween 80 increased enzyme activity by 20 % at 0.01 % (v/v), progressively decreasing the enzyme activity with its concentration. CTAB produced a significant decrease in the enzyme activity proportional to the detergent concentration. SDS presented a drastic negative effect on the enzyme activity, being the enzyme fully inactivated in the presence of 1 % (v/v) of SDS. Thus, Triton X-100 seems to be the most suitable detergent to modulated the enzyme properties of this enzyme.

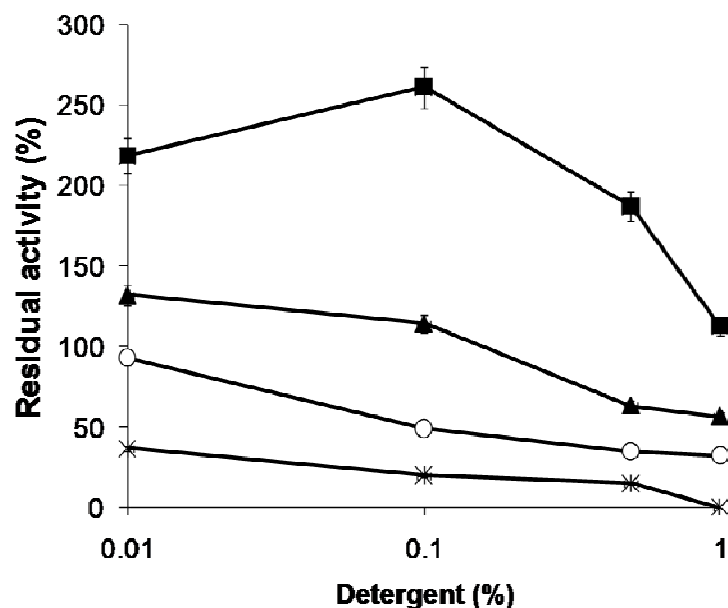


Figure 5 - Effect of the presence of detergents in SWL activity. (■) Triton X-100; (▲) CTAB; (○) Tween 80; (*) SDS. The experiment was performed at 25 °C in 25 mM sodium phosphate pH 7, added of the corresponding amount of detergent (see methods). Results are the mean of three experiments.

4. Conclusions

Lipases from newly isolated microorganisms are important enzymes that might bring some prospective for their industrial applications (e.g., in pharmaceutical, food or biodiesel industries). In this work, we were able to purify a lipase from a recently isolated strain of *S. warneri* using a simple and efficient one-step adsorption-desorption immobilization technique on hydrophobic supports. SWL could easily be purified to almost homogeneity from crude preparations by selective adsorption on butyl-Toyopearl and posterior incubation in the presence of Triton X-100 to produce a yield of approximately 100 % and a purification factor of 20. The enzyme activity could be increased by immobilization on octyl-agarose, as previously shown for other lipases. In order to study the effect of the detergent on the enzyme without protein-protein interactions, the enzyme was immobilized on CNBr-Sepharose, maintaining intact the enzyme activity and stability. This immobilized enzyme presented similar behaviour as the soluble enzyme and could be hyperactivated

by the presence of low concentrations of some non-ionic detergents such as Triton X-100, while ionic detergents presented a negative effect on the enzyme activity.

Acknowledgments

The authors gratefully recognize the support from the Spanish CICYT (project BIO-2005-8576) and CAM (project S0505/PPQ/0344). The authors also wish to thank CAPES (Brazil) for Ms Volpato's and Mr Rodrigues' scholarships.

References

- [1] Joseph B, Ramteke PW, Thomas G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. *Biotechnol Adv* 2008;26:457-470.
- [2] Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 2007;63:1721-1754.
- [3] Talon R, Dublet N, Montel M-C, Cantonnet M. Purification and Characterization of Extracellular *Staphylococcus warneri* Lipase. *Curr Microbiol* 1995;30:11-16.
- [4] Van Kampen MD, Rosenstein R, Götz F, Egmond MR. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol* 2001;1544:229-241.
- [5] Derewenda ZS, Sharp AM. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci* 1993;18:20-25.
- [6] Verger R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 1997;15:32-38.
- [7] Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Yamaguchi S, Joerger R, Haas MJ, Derewenda ZS. Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng* 1994;7:551-557.
- [8] Ericsson DJ, Kasrayan A, Johansson P, Bergfors T, Sandstrom AG, Backvall JE, Mowbray SL. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel

Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. *J Mol Biol* 2008;376:109-119.

[9] Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998;58:486-493.

[10] Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 1998;93:185-197.

[11] Palomo JM, Peñas MM, Fernández-Lorente G, Mateo C, Pisabarro AG, Fernández-Lafuente R, Ramírez L, Guisán JM. Solid-phase handling of hydrophobins: Immobilized hydrophobins as a new tool to study lipases. *Biomacromolecules* 2003;4:204-210.

[12] Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J Chromatogr A* 2004;1038:267-273.

[13] Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem* 2008;43:1061-1067.

[14] Fernández-Lorente G, Ortiz C, Segura RL, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Palomo JM. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 2005;92:773-779.

[15] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *J Chem Technol Biotechnol* 2008;83:821-828.

[16] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by

Staphylococcus warneri EX17. Biotechnol Bioprocess Eng 2009:accept for publication.

[17] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.

[18] Switzer III RC, Merril CR, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal Biochem 1979;98:231-237.

[19] Medin A. Studies on structures and properties of agarose. Uppsala, Sweden. Uppsala University; 1995.

[20] Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. Enzyme Microb Technol 2007;41:565-569.

[21] Palomo JM, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. Biomacromolecules 2003;4:1-6.

[22] Diaz JCM, Cordova J, Baratti J, Carriere F, Abousalham A. Effect of nonionic surfactants on *Rhizopus homothallicus* lipase activity: A comparative kinetic study. Mol Biotechnol 2007;35:205-214.

[23] Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. Biotechnol Bioeng 2007;97:242-250.

[24] Guncheva M, Zhiryakova D, Radchenkova N, Kambourova M. Effect of nonionic detergents on the activity of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* MC7. J Mol Catal B: Enzym 2007;49:88-91.

[25] Mogensen JE, Sehgal P, Otzen DE. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. Biochemistry 2005;44:1719-1730.

**Capítulo V - MODULATION OF A LIPASE FROM
Staphylococcus warneri EX17 USING IMMOBILIZATION
TECHNIQUES**

Artigo aceito para publicação no periódico: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques

Giandra Volpato^{1,2}, Marco Filice¹, Rafael C. Rodrigues^{1,2}, Júlio X. Heck³, Jose M. Guisan¹, Cesar Mateo^{1#} and Marco Antônio Záchia Ayub^{2*}

¹Departamento de Biocatálisis. Instituto de Catálisis-CSIC. Campus UAM. Cantoblanco. 28049 Madrid, Spain.

² Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves, 9500, P.O. Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Technical School, Federal University of Rio Grande do Sul State, Rua Ramiro Barcelos, 2777, ZC 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Dr Marco Antônio Záchia Ayub

E-mail: mazayub@ufrgs.br; Phone: + 55 (51) 33086685 ; Fax: +55 (51) 33087048

Co-corresponding author: Prof. Dr Cesar Mateo

E-mail: ce.mateo@icp.csic.es; Phone: +34 915854760; Fax: +34 915854809

Modulation of a lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 using immobilization techniques

Abstract

This research describes the modulation of a purified lipase from *S. warneri* strain EX17 (SWL) by immobilization on glyoxyl, cyanogen bromide or octyl agarose. The immobilization on glyoxyl agarose at pH 10 and 25 °C, conditions in which the enzyme is readily inactivated, was attained by the stabilization of the soluble enzyme by addition of 25% glycerol, with good activity retention. This was the most stable preparation under thermal inactivation at pH 5 to 9, in the presence of either cosolvents or detergents. The high stability allowed this preparation to be hyperactivated by concentrations of Triton X-100, which would produce negative effects over enzyme activity of other preparations.

Immobilized SWL hydrolyzed different chiral esters, such as (\pm) methyl mandelate, (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid, and (\pm)-2-hydroxy-4-phenylbutyric acid ethyl ester, being its specificity depended on the protocol of immobilization. The enantiospecificity was also strongly modulated by the immobilization. Thus, using HPBEt as substrate, octyl-SWL exhibited an opposite enantiospecificity to the other 2 biocatalysts, and was the most enantioselective in the hydrolysis of (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid.

Key words: modulation of lipases; enzyme stabilization; interfacial activation; hyperactivation by detergents; glyoxyl-agarose; glycerol as protein stabilizer.

1. Introduction

The immobilization of enzymes is a convenient way to use them as industrial biocatalysts, especially when the enzymes are stable enough and can be reused for several reaction cycles [1, 2]. Moreover, if the immobilization protocol is properly designed to give an intense multipoint covalent attachment, the immobilization may be a powerful way to improve the enzyme rigidity, which increases enzyme stability against any distorting agents [3, 4]. However, to obtain intense multipoint covalent attachment is not easily achieved, requiring the selection of a suitable support and the use of proper immobilization conditions [5]. Beads of glyoxyl agarose have shown to produce high stabilization factors, 2 to 5 orders of magnitude, when used to immobilize many different enzymes [6].

Lipases are the most broadly used enzymes in biocatalysis in order to produce very different compounds, from structured oils and biodiesel, to fine chemicals [7-10]. One particular feature of lipases is their susceptibilities to conformational changes in structure, changing between a closed form, where the active centre is secluded from the medium by a oligopeptide chain called flat or lid, and an open form where this lid is shifted and the active centre is exposed [11, 12]. In contact with hydrophobic surfaces, such as oil drops [12], the open form of lipase is adsorbed, involving the large hydrophobic surface formed by the inner side of the lid and the active centre. In the specific case of lipases, one useful immobilization technique is the interfacial activation of the lipase by adsorption of the open form of the enzyme on hydrophobic supports at low ionic strength [13, 14]. This simple strategy allows the preparation of hyperactivated lipases and, in many cases, some stabilization of the enzyme may be achieved [15]. These structural changes in the enzyme might alter its selectivity. Therefore, immobilization of lipases by adsorption or covalent bonding involving different protein surface areas, which may cause different enzyme rigidity or microenvironment, has proved to be in many cases a powerful tool to improve the enzyme selectivity [3, 16].

Staphylococcus warneri has been described as a lipase producing species, and for *S. warneri* M strain, four different lipases have been deposited

in the protein databases (accession numbers BAD90560, BAD90561, BAD90562, BAD90565) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). For *S. warneri* 863 strain two lipases, SWL1 and SWL2, have been already purified and partially characterized [17, 18], being SWL2 96 % identical to the protein deposited under accession number BAD90565. In this research, we have used an extracellular lipase from *S. warneri* strain EX17 that shows 100 % of identity with a protein fragment of the lipase deposited under accession number BAD90562 (results not shown). Our aims were to immobilize this lipase using different protocols: adsorption on hydrophobic support, mild covalent attachment, and multipoint covalent attachment. The stability and selectivity of these preparations were also studied.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 (SWL) was produced as previously described [19, 20]. Ethanolamine hydrochloride, hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB), Triton X-100, and *p*-nitrophenyl butyrate (*p*-NPB) were from Sigma. 1,4-Dioxane, diethyleneglycol dimethyl ether (diglyme), and dimethylformamide (DMF) was from Fluka. Butyl-toyopearl 650M was from Tosoh Corporation. Octyl-sepharose CL-4B and cyanogen bromide activated Sepharose 4B (CNBr) were purchased from GE Healthcare. Cross-linked agarose (10 BCL) was kindly donated by Hispanagar S.A. (Burgos, Spain) and its modification to glyoxyl agarose (activated with 200 $\mu\text{mol/g}$ of support) was performed as described elsewhere [21]. Other reagents and solvents used were of analytical or HPLC grade.

2.2. Methods

2.2.1. Lipase activity assay

This assay was performed by measuring the increase in the absorbance at 348 nm produced by the release of *p*-nitrophenol in the hydrolysis of 0.4 mM pNPB in 25 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C, using a thermostated spectrum with continuous magnetic stirring. To initiate the reaction, 0.05 mL of

lipase solution or suspension was added to 2.5 mL of substrate solution. In some instances, detergents were added to the reaction mixtures. One unit of pNPB activity was defined as the amount of enzyme necessary to hydrolyze 1 μ mol of pNPB/min (U) under the conditions described above.

2.2.2. Purification of SWL

The purification was carried out following a previously described procedure (Volpato et al., *in press*) by the interfacial activation against hydrophobic supports [14]. The crude SW protein extract was diluted with 10 mM sodium phosphate pH 7.0. Butyl-toyopearl was added and maintained under continuous stirring. Periodically, the activities of suspensions and supernatants were measured by using the pNPB assay. After completion of the adsorption process, the support with the adsorbed proteins was vacuum filtered using a sintered glass funnel and abundantly washed with distilled water. SWL was desorbed from the hydrophobic support by suspending the immobilized enzyme in a relation 1:10 (w/v) in 25 mM sodium phosphate pH 7.0 at 4 °C containing 0.5 % of Triton X-100.

2.2.3. Immobilization of SWL on octyl-agarose

Purified SWL was diluted with 10 mM sodium phosphate pH 7 to obtain a very low concentration of Triton X-100 that allows the immobilization on octyl-agarose support at 4 °C and pH 7, for 1 h. The immobilized enzyme derivative was prepared using 1 g of octyl-agarose support and 100 mL of diluted purified SWL. After immobilization, the SWL immobilized preparation was recovered by filtration and washed with abundant water. This immobilized enzyme was called octyl-SWL.

2.2.4. Immobilization of SWL on CNBr-activated support

Purified SWL was immobilized on CNBr-activated support at 4 °C and pH 7, for 15 min to reduce the possibilities of getting a multipoint covalent attachment between enzyme and support. The enzyme-support reaction was ended by incubating the support with 1 M ethanolamine at pH 8 for 2 h. During

the immobilization and further blocking of the support, the suspension was submitted to continuous gentle stirring. Finally, the immobilized SWL preparation was vacuum filtered using a sintered glass funnel and washed with abundant water to eliminate the detergent. This immobilized enzyme was called CNBr-SWL.

2.2.5. Immobilization of SWL on glyoxyl-agarose beads

SWL was desorbed from butyl-toyopearl and the pH was adjusted with 1 M sodium bicarbonate at pH 10 to obtain a final concentration of 100 mM. The immobilized enzyme derivative was prepared using 1 g of glyoxyl-support and 10 mL of purified SWL in the presence or absence of 25 % of glycerol. The mixture was maintained at 25 °C during the specified times. As reaction endpoint, solid sodium borohydride was added to a concentration of 1 mg/mL [22] and the mixture was maintained at 25 °C under very gentle stirring. After 30 min, the immobilized and reduced derivatives were washed thoroughly with distilled water. This immobilized enzyme was called Gx-SWL.

2.2.6. Effect of pH and temperature on the stability of different SWL immobilized preparations

The different SWL preparations were incubated in 25 mM sodium acetate pH 5 and 55 °C, 25 mM sodium phosphate pH 7.0 and 60 °C, or 25 mM sodium bicarbonate pH 9 and 50 °C. Samples were periodically withdrawn using a pipette with a cut-tip and under vigorous stirring to have a homogeneous biocatalyst suspension. The activity was measured using the pNPB assay described above. The experiments were carried out in triplicates and the plotted results are the mean of these repetitions.

2.2.7. Inactivation of different SWL immobilized preparations in the presence of organic cosolvent

Enzyme derivatives were washed with a mixture of 50 % of solvent:50 % of 50 mM sodium phosphate aqueous solution at final pH 7 and 4 °C. Subsequently, the enzyme derivatives were resuspended in the same solution

and incubated at 4 °C. Samples were periodically withdrawn, and the activity was checked following the above described assay. Experiments were carried out in triplicates and the plotted results are the mean of these repetitions.

2.2.8. Effect of detergents on the activity and stability of different SWL immobilized preparations

To evaluate the effect of detergents on lipase activity, the lipase activity was assayed with different detergents at different concentrations. To determine the stability of SWL immobilized preparations, they were incubated in the presence of various detergents at 25 °C for 1 h, at specified concentrations. The residual lipase activity was determined under standard assay conditions.

2.2.9. Enzymatic hydrolysis of esters

The activities of different immobilized preparations of SWL were analyzed in the hydrolysis reaction of three different chiral esters: (±)-methyl mandelate (**1**), (±)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid (**2**), and (±)-2-hydroxy-4-phenyl-butyric acid ethyl ester (**3**). Substrates (**1**) and (**3**) were dissolved to a concentration of 1 mM, in 2 mL of 25 mM sodium phosphate pH 7 and at 25 °C. Then, 0.5 g of immobilized SWL preparation was added to these esters solutions. Substrate (**2**) was dissolved to a concentration of 1mM in 2 mL of 25 mM sodium acetate pH 5 or pH 7, in both cases at 25 °C. Then, 0.5 g of immobilized SWL preparation was added to these solutions.

The degree of hydrolysis was analyzed by reverse-phase HPLC (Spectra Physic SP 100 coupled with an UV detector Spectra Physic SP 8450). For these assays a Kromasil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5µm ø) column was used, the mobile phase was 20 % acetonitrile/ 80 % 10 mM ammonium phosphate (v/v) pH 2.9, for (**1**); (35:65 v/v) for (**2**); and (40:60 v/v) for (**3**) at 1.5 mL/min, and UV detection was performed at 225 nm for all the substrates.

2.2.10. Determination of enantiomeric excess and enantioselectivity

The enantiomeric excess of the released acid (ee_p) (at conversions between 10 % and 15 %) was analyzed by Chiral Reverse Phase HPLC. The

column was a Chiracel OD-R, the mobile phase was an isocratic mixture of acetonitrile:NaClO₄ 0.5 M, (20:80 v/v) for compound (3), (5:95 v/v) for compound (2), and an isocratic mixture of acetonitrile:10 mM ammonium dihydroxy phosphate (30:70 v/v) for compound (1). The final pH of the three mobile phases was adjusted to 2.3 with HCl and the flow was 0.5 mL/min, performing the UV detection at 210 nm.

The enantiomeric ratio (E) was calculated in all cases using eq. 1 reported by Chen et al. [23]:

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_p)]}{\ln[1 - c(1 - ee_p)]} \quad (1)$$

Where: c is the conversion ratio of reaction, ee_p is the enantiomeric excess of the formed enantiomer.

3. Results

3.1. Stability of SWL at pH 10

The immobilization of SWL on glyoxyl-agarose needs to be performed at pH 10 [21], and 25 °C is the recommended temperature in order to have good enzyme-support multi-point reaction [5]. However, under these conditions, activity was decreased by more than 70% after 30 minutes (Figure 1). Temperature reduction to 4 °C produced a slower inactivation, with only 30 % of activity loss after 6 h. It would, therefore, be interesting to find some additives capable to stabilize the enzyme under these conditions, which could favour multipoint immobilization. Some poly hydroxyl compounds [24-26], such as 25 % (v/v) glycerol or 25 % (v/v) polyethylene glycol, were found to be able to stabilize the enzyme, being glycerol the best stabilizing agent. For instance, using this stabilizing reagent, the reduction on SWL activity at 25 °C and pH 10 was similar to that at 4 °C in absence of this additive, while in the presence of 25 % glycerol, loss of SWL activity was negligible at 4 °C.

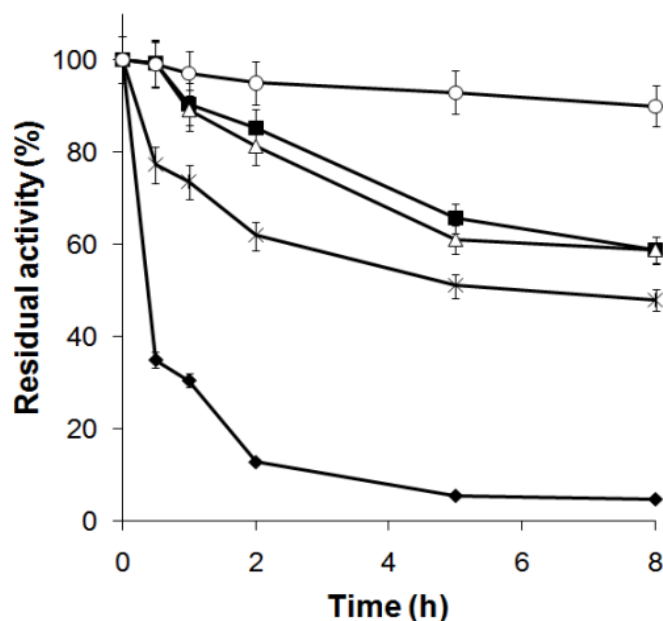


Figure 1 - Stability of soluble SWL at pH 10 under different experimental conditions. (◆) 25 °C; (■) 4 °C; (○) 4 °C in the presence of 25% of glycerol; (△) 25 °C in the presence of 25% of glycerol; (*) 25 °C in the presence of 25% of polyethyleneglycol.

3.2. SWL immobilization on glyoxyl agarose

Figure 2 shows the course of immobilization of SWL on glyoxyl agarose at 25 °C in the presence or absence of 25 % glycerol. Rates of immobilization were similar in both cases and full immobilization was achieved after 90 minutes of enzyme-support incubation. After this time, in the absence of glycerol, the immobilized enzyme retained around 45 % of its initial activity, while the soluble enzyme was fully inactivated under these conditions. This suggests that the immobilized enzyme was already stabilized against the inactivation at pH 10, at the time the enzyme was reacting with the support. When the immobilization was performed in the presence of glycerol, the retained activity was around 80 %. This preparation was selected for all other assays.

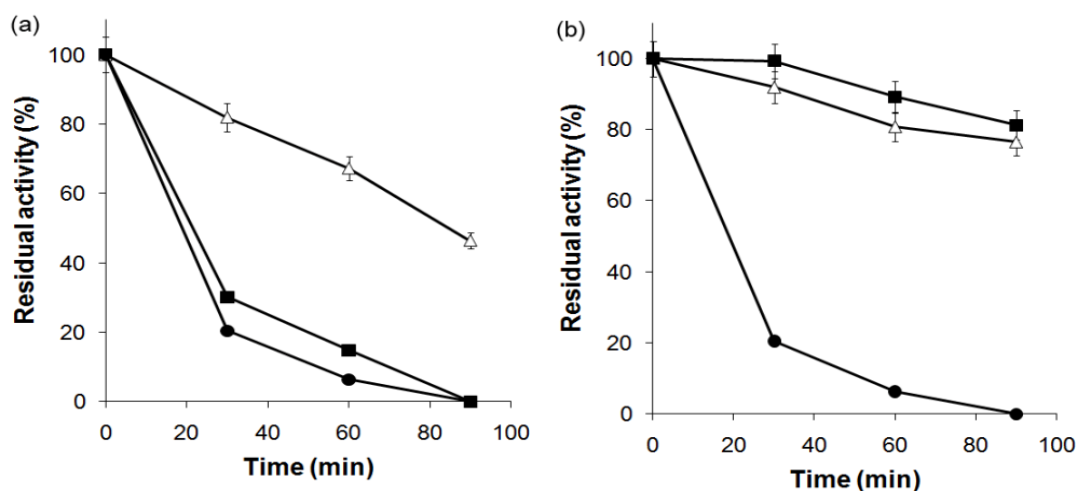


Figure 2 - Immobilization course of *S. warneri* EX17 on glyoxyl-agarose at pH 10 and 25 °C. (a) in the absence of glycerol; (b) with 25 % of glycerol. (■) control suspension; (△) immobilization suspension; (●) supernatant of the immobilization suspension. Results are the mean of triplicates.

3.3. SWL immobilization on octyl and CNBr agarose

Figure 3a shows the immobilization on octyl agarose. The immobilization proceeds rapidly and increases enzyme activity by a 1.6 fold factor. This result agrees with previous results of immobilization of other lipases in octyl agarose [14]. The immobilization of SWL on CNBr was slower (Figure 3b), and the immobilized enzyme activity remained unaltered. This suggested a very mild immobilization.

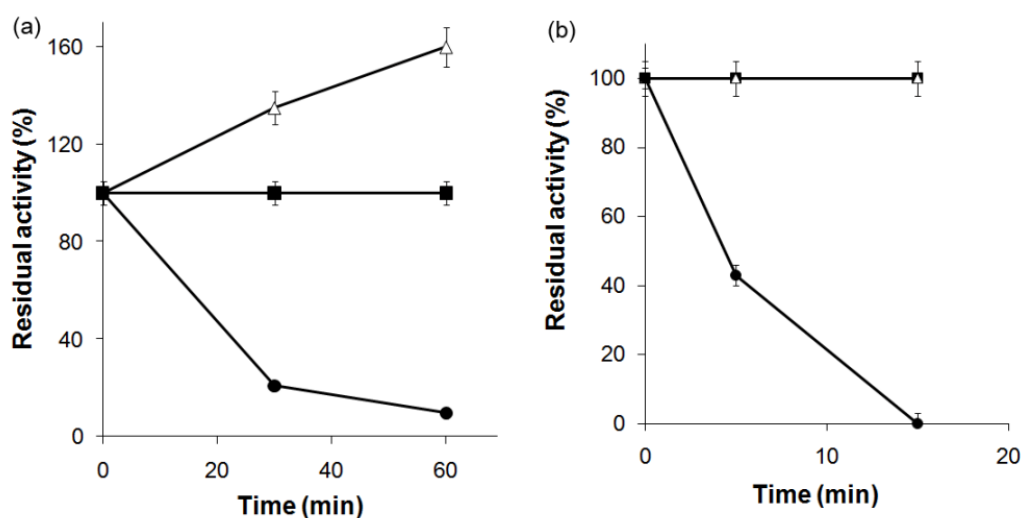


Figure 3 - Immobilization course of *S. warneri* EX17 on: (a) octyl-agarose; (b) CNBr-agarose. (■) control suspension; (△) immobilization suspension; (●) supernatant of the immobilization suspension. Results are the mean of triplicates.

3.4. Stability of the different enzyme preparations

Figure 4 shows the effect of the incubation at high temperature on the activity of the 3 preparations at different pH values. The Gx-SWL preparation was the most stable one: 40 times at pH 7 and 9, and 160 times at pH 5 when compared with octyl-SWL. At pH 5 and 7, the stability of CNBr-SWL and octyl-SWL biocatalysts were similar, while at pH 9, octyl-SWL was 10 times less stable. These results contrast with findings for many other lipases, for which the interfacially activated enzymes were more stable than the standard covalent and glyoxyl preparations [15].

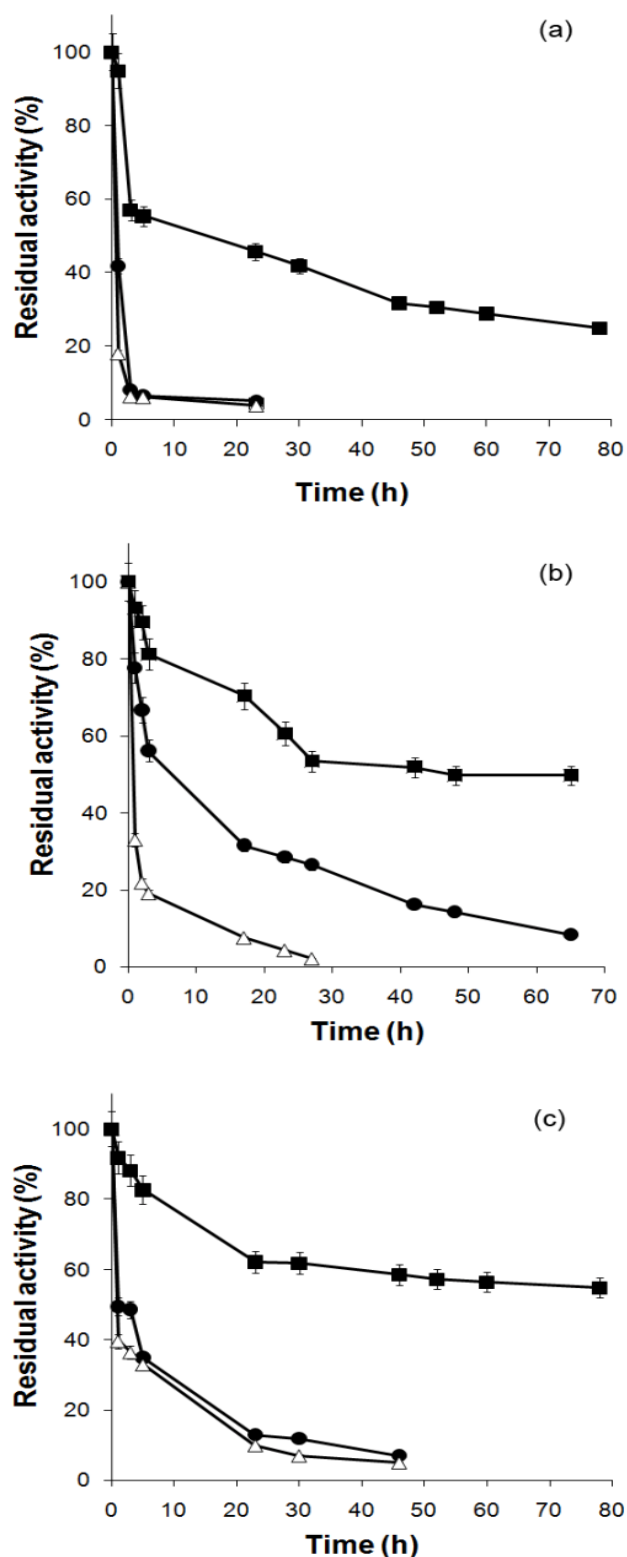


Figure 4 - Inactivation courses of different SWL immobilized preparations at: (a) 60 °C and pH 7,0; (b) 50 °C and pH 9,0; (c) 55 °C and pH 5,0. (●) CNBr-SWL; (△) Octyl-SWL; (■) Gx-SWL. Results are the mean of triplicates.

Figure 5 shows the stability of the covalently immobilized SWL preparations in the presence of different organic solvents. In these experiments, octyl-SWL was not studied because this immobilization system can release some lipase molecules to the medium in the presence of 50 % cosolvent, making complex the understanding of the phenomena occurring. The immobilized SWL was quite stable at 4 °C in the presence of dioxane and dimethyl formamide, retaining over 80 % of its activity after 4 h, while for diglyme its stability was lower, with only 30-40 % of activity remaining after 4 h. Of all biocatalysts, the glyoxyl preparation was found to be the most stable.

3.5. Effect of the detergent on the enzyme activity and stability

Detergents have been described to have a complex effect on lipases. They can stabilize the open form of lipases, increasing their activity; but they also may have a negative effect on the lipase stability and even act as competitive inhibitors [27]. Moreover, detergents have been proposed as a simple way to modulate the enzyme selectivity [28]. This means that enzyme molecules with different rigidity, may present a different behaviour when incubated in the presence of detergents.

Figure 6 shows the effect of different detergent in the activity of the covalent preparations of SWL. Octyl-SWL cannot be used in this case because of the risk of enzyme desorption. Triton X-100 enhanced enzyme activity for CNBr-SWL and Gx-SWL preparations, but their behaviours were quite different. CNBr-SWL increased the activity 2.5 times at 0.1 % Triton X-100 concentration, while with 0.5 % the activity decreased 1.5 times and with 1 % the activity was similar to that of the enzyme in absence of detergent. Using Gx-SWL, the maximal activity was obtained at 0.5 % concentration, over 3 times higher than the activity in the absence of detergent, and at 1 % the activity was 2.5 times higher.

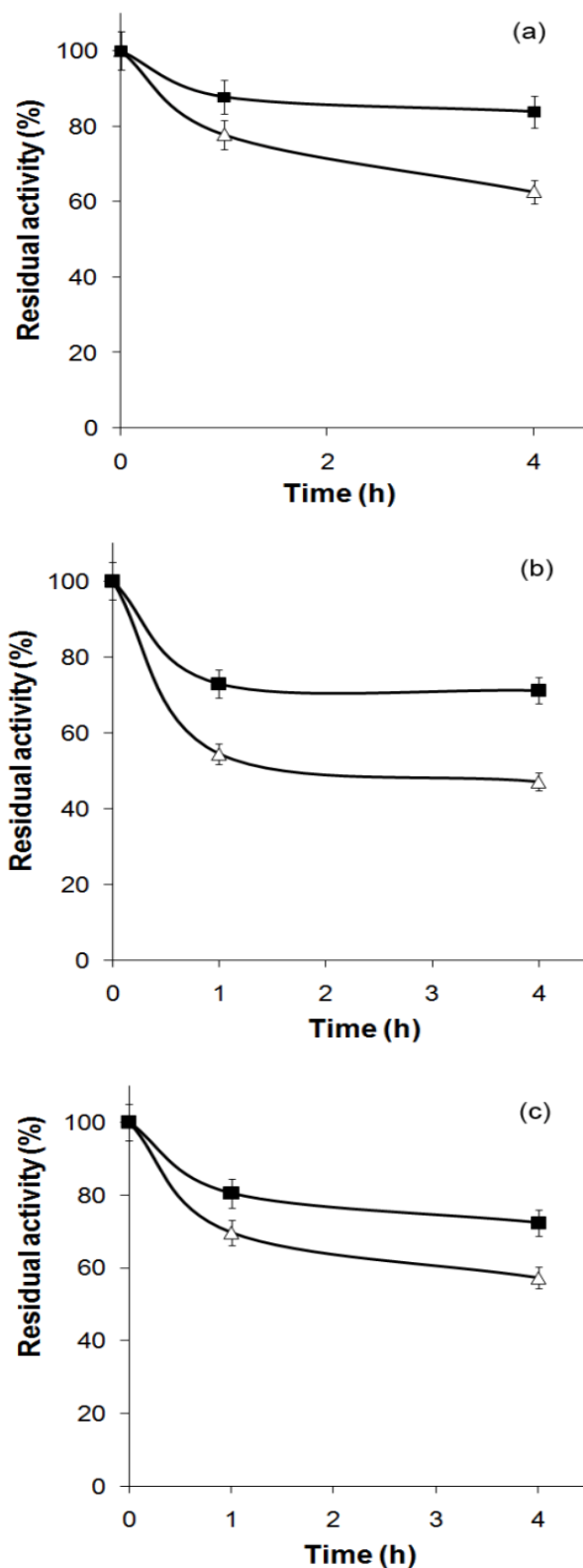


Figure 5 - Inactivation courses of SWL preparations in the presence of 50% of cosolvent at pH 7 and 4 °C (a) Dioxane; (b) Diglyme; (c) DMF. (Δ) CNBr-SWL; (\blacksquare) Gx-SWL. Results are the mean of triplicates.

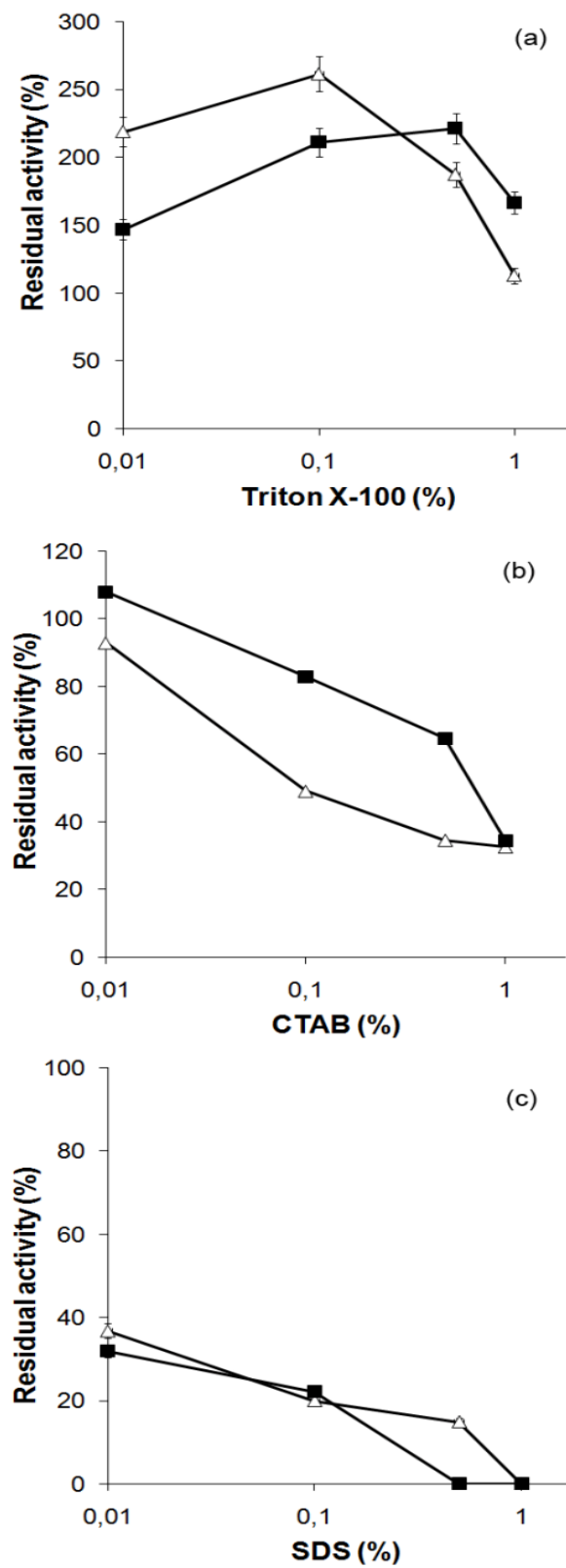


Figure 6 - Effects of detergents on SWL activity. (a) Triton X-100; (b) CTAB; (c) SDS. (△) CNBr-SWL; (■) Gx-SWL.

CTAB caused a decrease in the CNBr-SWL activity even at the lowest concentration studied (0.01 %), while at 1 % the residual activity was around 20 % of that in absence of detergent. Using Gx-SWL, 0.1 % CTAB produced a slight increment of enzyme activity, although at higher concentrations it produced a decrease in enzyme activity to values similar of those observed for CNBr-SWL. Finally, SDS was found to be deleterious for the activity of both immobilized enzyme preparations, with no significant differences observed between the two preparations.

To understand whether the main effect produced by the detergents was inhibition or inactivation, the immobilized enzymes were incubated in the presence of 0.5 % of each of the 3 detergents and the residual activity determined after 1 h (Table 1). At a concentration of 0.5 %, (v/v) Triton X-100 produced a decrease in the activity of CNBr-SWL, while there was a small increment of enzyme activity for Gx-SWL. CTAB and SDS produced a decrease in the activity of CNBr-SWL. These results suggest that the ionic detergents produced the inactivation of the enzymes. In the case of Triton X-100, it seems a more complex effect: for Gx-SWL, there is a positive conformational change, while this is negative for CNBr-SWL. This is suggesting that Triton X-100 could produce the “opening” of the lipase, but also some other negative effects, which are less important in a more stable derivative as Gx-SWL.

Table 1 - Effect of detergents on the stability of SWL preparations

Detergent (0.5%)	Residual activity* (%)	
	CNBr-SWL	Gx-SWL
Control	100	100
Triton X-100	74.8	174.6
CTAB	30.8	55.2
SDS	7.2	6.6

* The preparations were incubated by 1 h in each detergent and the activity was measured after this time.

The higher stability of Gx-SWL during thermal inactivation at different pH in the presence of organic solvents and detergents, suggested that the glyoxyl

preparations were stabilized via multipoint covalent attachment, which produces more rigid enzyme structures, thus with less tendency to conformational changes [3].

3.6. Effect of the immobilization protocol on the enantiospecificity of SWL

In order to test properties of the lipase systems after different protocols of immobilization, they were used in the hydrolysis of three different chiral ester, (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid, (\pm)-methyl mandelate, and (\pm)-HPBEt. Table 2 shows the results for the hydrolysis of (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid. At pH 7, the most active enzyme was the immobilized on octyl-agarose, about 5 times more active than the other 2 immobilized SWL, while at pH 5 there was a decrease in the activity of this preparation, while the other 2 preparations suffered even a slight increase in the activity. Regarding the enantiomeric ratio, the highest value was obtained for the octyl preparation (E = 56) favoring the formation of the R-isomer. The other preparations presented a low but significant enantiospecificity for the same isomer, except the Gx-SWL at pH 5, showing higher activity for the S isomer (E = 4).

Table 2 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid

Preparation	pH	Specific activity ^a	ee _p ^b	Preferred enantiomer	E
Octyl-SWL	7	0.063	94	R	56.3
	5	0.016	44	R	2.6
CNBr-SWL	7	0.012	42	R	2.4
	5	0.015	51	R	3.1
Gx-SWL	7	0.013	21	R	1.5
	5	0.015	59	S	3.9

Experiments were performed at 25 °C. ^a Specific activity in U.h⁻¹mg_{prot.}⁻¹. ^b Enantiomeric excess of product.

For the hydrolysis of racemic methyl mandelate (Table 3), only octyl-SWL produced significant amounts of product allowing determining enantiomeric ratio. Surprisingly, this biocatalyst was more active against this compound, almost twice as much as for (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid under similar conditions, while the other preparations were almost fully inactive against racemic methyl mandelate and quiet active against (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid.

Table 3 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of (\pm)-methyl mandelate

Preparation	Specific activity ^a	ee _p ^b	Preferred enantiomer	E
Octyl-SWL	0.195	29	S	3.5
CNBr-SWL	nd ^c	nd	nd	nd
Gx-SWL	nd	nd	nd	nd

Experiments were performed at 25 °C and pH 7. ^aSpecific activity in U.h⁻¹mg_{prot.}⁻¹. ^bEnantiomeric excess of product. ^cNot detected.

For the hydrolysis of HPBEt (Table 4) the most active preparations were CNBr-SWL, followed by octyl-SWL, while the most enantioselective was octyl-SWL (E = 19), with the other two preparations showing almost no selectivity in this reaction.

Table 4 - Performance of different SWL preparations for enzymatic hydrolysis of HPBEt

Preparation	Specific activity ^a	ee _p ^b	Preferred enantiomer	E
Octyl-SWL	0.067	8	R	1.2
CNBr-SWL	0.072	81	S	18.8
Gx-SWL	0.044	27	S	1.7

Experiments were performed at 25 °C and pH 7. ^aSpecific activity in U.h⁻¹mg_{prot.}⁻¹. ^bEnantiomeric excess of product.

The results presented in this section show that this lipase has a broad range of substrates and its properties might be greatly modulated by different

immobilization protocols. Thus, the use of these different immobilization strategies may be used in order to increase the applicability of this novel and interesting enzyme.

4. Conclusions

Lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 could be immobilized following three different protocols (adsorption on hydrophobic supports, mild and multipoint covalent attachments). The low stability of the enzyme at pH 10, which is a conditions required to immobilize the enzyme on glyoxyl agarose, could be improved by the addition of some polyols such as 25 % glycerol. This allowed immobilizing the enzyme in glyoxyl-agarose at pH 10 retaining about 80 % of activity. Immobilizations on CNBr have the same effect on the enzyme activity, while immobilization on octyl-sepharose increased the enzyme activity 1.6 times.

Gx-SWL showed the highest stability during thermal inactivation at all pH values, or in the presence of cosolvents, suggesting the promotion of a fairly intense support-enzyme covalent multipoint attachment. Moreover, all covalently immobilized SWL showed a hyperactivation in the presence of moderate concentrations of Triton X-100. Ionic detergents showed a more negative impact in activities, with results suggesting that they could inactivate immobilized SWL, although Gx-SWL system was somehow a little more resistant to this inactivation, perhaps due to the higher stability of this preparation.

SWL was able to hydrolyse different chiral esters, showing the broad specificity of this enzyme, granting some possible applications of the enzyme in fine chemistry. The specificity of the lipase to different substrates was strongly modulated by the immobilization protocol. CNBr-SWL was the most active preparation against HPBet, while octyl-SWL was the most active against the other two substrates. Moreover, the experimental conditions affected in a very different way the activity of the different preparations. Concerning SWL enantioselectivity, it was also possible to greatly modulate it through the immobilization technique employed. For example, using HPBEt as substrate,

octyl-SWL exhibited an opposite enantiospecificity to the other 2 biocatalysts and was the most enantioselective in the hydrolysis of (\pm)-2-O-butyryl-2-phenylacetic acid. With this substrate, Gx-SWL at pH 5 again showed an inverse enantiopreference compared to the other preparations. All these results show that this lipase may be greatly improved via the so-called "conformational engineering".

Acknowledgments

The authors gratefully recognize the support from the Spanish CICYT (project. BIO-2005-8576) and CAM (project S0505/PPQ/0344). The authors also wish to thank CAPES (Brazil) for Ms Volpato's and Mr Rodrigues' scholarships.

References

- [1] Hartmeier W. Immobilized biocatalysts - from simple to complex systems. *Trends Biotechnol* 1985;3:149-153.
- [2] Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures. *Trends Biotechnol* 1993;11:471-478.
- [3] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1451-1463.
- [4] Gianfreda L, Scarfi MR. Enzyme stabilization: State of the art. *Mol Cell Biochem* 1991;100:97-128.
- [5] Pedroche J, Yust MDM, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Girón-Calle J, Alaiz M, Vioque J, Guisán JM, Millán F. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1160-1166.

- [6] Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, López-Gallego F, Pessela BCC, Hidalgo A, Fernández-Lorente G, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:274-280.
- [7] Jaeger K-E, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol* 1998;16:396-403.
- [8] Ghanem A. Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 2007;63:1721-1754.
- [9] Villeneuve P. Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol Adv* 2007;25:515-536.
- [10] Rodrigues RC, Volpato G, Wada K, Ayub MAZ. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. *J Am Oil Chem Soc* 2008;85:925-930.
- [11] Derewenda ZS, Sharp AM. News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci* 1993;18:20-25.
- [12] Verger R. 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 1997;15:32-38.
- [13] Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 1998;58:486-493.
- [14] Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 1998;93:185-197.
- [15] Palomo JM, Muñoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and

stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B: Enzym* 2002;19-20:279-286.

[16] Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb Technol* 2002;31:775-783.

[17] Talon R, Dublet N, Montel M-C, Cantonnet M. Purification and Characterization of Extracellular *Staphylococcus warneri* Lipase. *Curr Microbiol* 1995;30:11-16.

[18] Van Kampen MD, Rosenstein R, Götz F, Egmond MR. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. *Biochim Biophys Acta, Protein Struct Mol Enzymol* 2001;1544:229-241.

[19] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Production of organic solvent tolerant lipase by *Staphylococcus caseolyticus* EX17 using raw glycerol as substrate. *J Chem Technol Biotechnol* 2008;83:821-828.

[20] Volpato G, Rodrigues RC, Heck JX, Ayub MAZ. Effects of oxygen volumetric mass transfer coefficient and pH on lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2009:accept for publication.

[21] Mateo C, Abian O, Ernedo MB, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Grazu V, Pessela BCC, Giacomini C, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb Technol* 2005;37:456-462.

[22] Mateo C, Palomo JM, Fuentes M, Betancor L, Grazu V, Lopez-Gallego F, Pessela BCC, Hidalgo A, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme Microb Technol* 2006;39:274-280.

[23] Chen C-S, Fujimoto Y, Girdaukas G, Sih CJ. Quantitative Analyses of Biochemical Kinetic Resolutions of Enantiomers. *J Am Chem Soc* 1982;104:7294-7299.

[24] Sola-Penna M, Ferreira-Pereira A, Lemos ADP, Meyer-Fernandes JR. Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme. *Eur J Biochem* 1997;248:24-29.

[25] Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J* 1993;65:661-671.

[26] Meng FG, Park YD, Zhou HM. Role of proline, glycerol, and heparin as protein folding aids during refolding of rabbit muscle creatine kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:701-709.

[27] Mogensen JE, Sehgal P, Otzen DE. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. *Biochemistry* 2005;44:1719-1730.

[28] Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnol Bioeng* 2007;97:242-250.

Capítulo VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho permitiu aprofundar os conhecimentos sobre uma série de aspectos que envolvem as lipases, principalmente sua produção, purificação, seu mecanismo de ação, hiperativação, a forma de imobilização e sua consequência nas propriedades da enzima.

Na primeira etapa deste trabalho foi otimizada a produção de lipases por *Staphylococcus warneri* EX17 através de duas ferramentas estatísticas, o planejamento Plackett-Burman (P-B) seguido de um delineamento composto central rotacional (DCCR). O planejamento P-B foi utilizado com o objetivo de selecionar as variáveis mais importantes na produção de lipase por *S. warneri*, uma vez que este tipo de planejamento é indicado quando se tem muitas variáveis a serem estudadas e/ou pouco conhecimento do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Uma das variáveis abordadas foi a concentração de glicerol, e em nível de comparação, a concentração de glicose, baseando-se em um dos principais objetivos desta tese, que envolve a produção de lipase em um meio contendo glicerol como fonte de carbono, em função do aumento da produção de biodiesel e conseqüentemente deste subproduto. Neste momento verificou-se que a variável concentração de glicerol foi altamente significativa na produção de lipase por *S. warneri*, enquanto a concentração de glicose não apresentou efeito significativo. Após selecionar as variáveis mais significativas neste processo, foi realizado um DCCR, onde a produção de lipases foi otimizada.

Também nesta etapa foi estudada a utilização de glicerol residual, oriundo da síntese enzimática de biodiesel, para produção de lipases. Comparando-se os resultados obtidos quando utilizou-se glicerol comercial e glicerol residual, verificou-se uma alta similaridade nos dados de crescimento do microrganismo, consumo de glicerol e produção de lipase. Tais resultados indicam ser possível utilização deste barato e excedente subproduto da síntese de biodiesel para produção de lipase por *S. warneri* EX17.

Verificou-se ainda, que o extrato enzimático produzido foi bastante estável na presença de solventes orgânicos, metanol, etanol e η -hexano,

possibilitando o uso desta enzima como biocatalisador em diversas reações de síntese orgânica.

Em um segundo momento, ainda com o objetivo voltado na melhoria da produção da enzima, foi estudado, em biorreatores, a influência da taxa de transferência de oxigênio (k_{La}), e também do controle de pH durante o cultivo submerso. Esses experimentos demonstraram que ambos os fatores (k_{La} e pH) são de grande importância na produção de lipases por *S. warneri*. Com o ajuste destas variáveis conseguiu-se um aumento de até 5 vezes na produção da enzima.

Com as variáveis importantes na produção da enzima otimizadas, todas as atenções foram direcionadas à parte de purificação da lipase produzida. Nesta etapa buscaram-se metodologias de purificação bastante simples, e baseando-se no mecanismo de atuação da maioria das lipases, conseguiu-se com apenas um passo de adsorção em um suporte hidrofóbico e desorção com detergentes, a completa purificação de uma lipase de 40 kDa. Nesta etapa também verificou-se a hiperativação da lipase na presença de detergentes, confirmando que esta lipase, assim como a maioria destas enzimas apresenta o mecanismo de ativação interfacial, levando ao aumento de sua atividade em até 2,5 vezes na presença de 0,1% de triton X-100.

Após a obtenção da lipase purificada, esta foi imobilizada em distintos suportes. Os suportes foram escolhidos a fim de alcançar a enzima imobilizada em distintas conformações, e assim estudar a influência do modo de imobilização nas propriedades da enzima. Os suportes utilizados foram: octil-agarose, com o objetivo de imobilizá-la na sua forma aberta; agarose ativada com brometo de cianógeno, onde a imobilização ocorre covalentemente através de uma única ligação entre a enzima e o suporte; agarose ativada com glioxil, esta imobilização também é covalente, porém multipontual, o suporte se liga aos grupos lisina da superfície da enzima, ocorrendo uma maior rigidificação da estrutura da enzima. Os resultados obtidos nesta etapa demonstraram uma grande influência do método de imobilização nas propriedades da enzima, principalmente quanto a sua estabilidade e enantioseletividade. Esta última é uma das principais características das

lipases, permitindo seu uso em química fina. Quando a lipase foi imobilizada em agarose ativada com glioxil, apresentou uma alta estabilidade térmica comparada aos demais imobilizados. Porém a maior enantioseletividade, quando utilizado como substrato o ácido (*R,S*)-2-butirol-2-fenilacético, foi verificada quando a enzima estava imobilizada em octil-agarose, inclusive apenas imobilizada desta forma foi capaz de hidrolisar o componente mandelato de metilo. A maior enantioseletividade na hidrólise de 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HPBEt) foi alcançada quando a enzima estava imobilizada em agarose ativada com brometo de cianógeno. Demonstrando que o método de imobilização foi capaz de causar mudanças conformacionais importantes na estrutura desta enzima.

Em conclusão, os estudos realizados neste trabalho demonstram a melhoria da produção de lipase a partir de estudos de condições de cultivo, destacando a taxa de transferência de oxigênio. Os resultados obtidos apontam para a viabilidade da utilização de um abundante subproduto (glicerol residual gerado na síntese de biodiesel) para produção de uma enzima de alto valor agregado. Este resultado é de extrema importância do ponto de vista econômico, no que diz respeito a processos biotecnológicos, além de apresentar efeitos positivos do ponto de vista ambiental. A estratégia de purificação da enzima aplicada neste trabalho, em um único passo, tem uma grande importância a nível industrial, uma vez que este processo pode ser muito complicado e custoso. A lipase produzida apresentou propriedades muito interessantes, e em conjunto com técnicas de imobilização tem um grande potencial de aplicação em biocatálise.

Capítulo VII - PERSPECTIVAS

Este trabalho permitiu o estudo da produção submersa de lipases por *S. warneri* EX17, um isolado pouco explorado, além do estudo de purificação e imobilização da enzima e de suas propriedades. Os resultados obtidos demonstraram que esta enzima apresenta propriedades bastante interessantes, portanto novas explorações acerca desta merecem serem realizadas.

Quanto à produção da enzima:

- Estudar a produção em estado sólido, onde diversos resíduos agroindustriais podem ser estudados para utilização como suporte e fonte de carbono.

- Estudar a produção submersa através de batelada alimentada, esta técnica apresenta resultados bastante promissores quando a produção da enzima está associada ao crescimento celular.

- Estudar a manipulação genética com vistas à clonagem e expressão em sistemas mais eficientes

Quanto à enzima produzida:

- Estudar a imobilização em outros suportes, como em suportes multifuncionais, onde a lipase pode ser imobilizada em um mesmo suporte por diferentes mecanismos.

- Estudar a estrutura tridimensional da enzima através de cristalografia, desvendando desta forma o mecanismo de ação da lipase, a localização exata de seu sítio ativo e de seus aminoácidos, permitindo realizar imobilizações feitas de forma dirigida.

- Estudar a hidrólise de outros substratos importantes na química farmacêutica, na indústria de alimentos e indústria química.

- Estudar a aplicação da lipase livre e imobilizada na síntese de biodiesel, e a utilização para nova produção da lipase utilizando o glicerol gerado durante o processo.

- Estudar o aumento da enantioseletividade da lipase produzida através de outras técnicas de imobilização, ou através de mudanças nas condições experimentais, como pH, presença de co-solventes, etc.

Capítulo VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, G.P. **Diseño de herramientas bioquímicas para la ingeniería molecular de derivados inmovilizados de renina y β -Galactosidasa**. Tese de doutorado. Universidad Complutense de Madrid, Espanha, 1996.

AMARAL, P.F.F.; ALMEIDA, A.P.; PEIXOTO, T.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 339-344, 2007.

ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: Fundamentos, métodos y aplicaciones. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, p. 23-39, 1998.

BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W.M.Z.; RAZAK, C.N.A.; SALLEH, A.B. Enzymatic synthesis of fatty esters by hydrophobic lipase derivatives immobilized on organic polymer beads. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 72, p. 407-411, 1995.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J.M. A single step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 486-493, 1998.

BHATNAGAR, T.; BOUTAIBA, S.; HACENE, H.; CAYOL, J.L.; FARDEAU, M.L.; OLLIVIER, B.; BARATTI, J.C. Lipolytic activity from *Halobacteria*: Screening and hydrolase production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, p. 133-140, 2005.

BORNSCHEUER, U.T. Trends and Challenges in Enzyme Technology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 100, p. 181-203, 2005.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics For Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.** New York: John Wiley & Sons, 1978.

BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DERWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BJORKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S.A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491-494, 1991.

BUCHHOLZ, K. **Characterization of Immobilized Biocatalysts.** Weinheim: VCH, 1979.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. **Biocatalysts and Enzyme Technology.** Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

BURKERT, J.F.M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 77-84, 2004.

CARDENAS, J.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalyses B: Enzyme**, v. 14, p. 111-123, 2001.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C.; AGUIAR, C.L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L.D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R.O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CHANG, H.M.; LIAO, H.F.; LEE, C.C.; SHIEH, C.J. Optimize synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 432. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 307-312, 2005.

CHEN, J.Y.; WEN, C.M.; CHEN, T.L. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p. 311-316, 1999.

CHEN, S.; QIAN, L.; SHI, B. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 988-994, 2007.

CHENG, K.K.; ZHANG, J.A.; LIU, D.H.; SUN, Y.; LIU, H.J.; YANG, M.D.; XU, J.M. Pilot-scale production of 1,3-propanediol using *Klebsiella pneumonia*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 740-744, 2007.

CHISTI, Y.; JAUREGUI-HAZA, U.J. Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, p. 143-153, 2002.

CONDE, S.; FIERROS, M.; RODRÍGUEZ-FRANCO, M.I.; PUIG, C. Resolution of 1-(4-amino-3-chloro-5-cyanophenyl)-2-bromo-1-ethanol by lipase mediated enantioselective alcoholysis, hydrolysis and acylation. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 9, p. 2229-2232, 1998.

DEREWENDA, Z.S. Structure and function of lipases. **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 1-52, 1994.

DEREWENDA, Z.S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G.G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor mihei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, p. 818-839, 1992.

D'SOUZA, S.F. Immobilized enzymes in bioprocess. **Current Science**, v. 77, p. 69-79, 1999

ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 325-329, 2000.

EL-SHAFAEI, H.A.; REZKALLAH, L.A. Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. **Microbiological Research**, v. 152, p. 199-208, 1997.

ERICSSON, D.J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A.G.; BACKVALL, J.E.; MOWBRAY, S.L. X-ray structure of *Candida antarctica* lipase A shows a novel lid structure and a likely mode of interfacial activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, p. 109-119, 2008.

FANG, Y.; LU, Z.; LV, F.; BIE, X.; LIU, S.; DING, Z.; XU, W. A newly isolated organic solvent tolerant *Staphylococcus saprophyticus* M36 produced organic solvent-stable lipase. **Current Microbiology**, v. 53, p. 510-515, 2006.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J.M. Enzyme and protein engineering via immobilization and post-immobilization techniques. **Recent Resource Development in Biotechnology and Bioengineering**, v. 1, p. 299-309, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. **Biotechnology and Biengineering**, v.82, p. 232-237, 2003.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J.M.; GUISAN, J.M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061-1067, 2008.

FRIKHA, F.; LADJIMI, M.; GARGOURI, Y.; MILED, N. 3-D structure modelling of the *Staphylococcus simulans* lipase: conformational changes, substrate specificity and novel structural features. **FEMS Microbiology Letters**, v. 286, p. 207-221, 2008.

GALACTION, A.I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004.

GHAMGUIA, H.; MILED, N.; REBAÏ, A.; KARRA-CHÂABOUNI, M.; GARGOURI, Y. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 717-723, 2006.

GORDILHO, M.A.; MONTESINOS, J.L.; CASAS, C.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÁ, C. Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach. **Chemistry and Physics Lipids**, v. 93, p. 131-142, 1998.

GUISÁN, J.M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISÁN, J.M.; BLANCO, R.M. Stabilization of trypsin by multiple-point attachment to aldehyde-agarose gels. **Annals of the New York Academic Science**, v. 501, p. 67-72, 1987.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 149-155, 2000.

GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 518-526, 2007.

GUPTA, N.; MEHRA, G.; GUPTA, R. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, p. 361-368, 2004a.

GUPTA, R.; GUPTA N.; RATHI P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 763-781, 2004b.

GURR, M.I.; HARWOOD, J.L.; FRAYN, K.N. **Lipid Biochemistry: An Introduction**. Oxford: Blackwell Science, 2002.

HAAS, M.J. Patente No: 5697986, 1997.

HASAN, F.; ALI SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HEMACHANDER, C.; BOSE, N.; PUVANAKRISHNAN, R. Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 629-633, 2001.

HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N.B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, *in press*, 2008.

HUN, C.J.; RAHMAN, R.N.Z.A.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 147-151, 2003.

HYUK, J.W.; KIM, H.K.; LEE, C.Y.; OH, T.K. Biochemical properties and substrate specificity of lipase from *Staphylococcus aureus* B56. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 25-30, 2002.

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 260-265, 2005.

JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P.W.; KUMAR, P.A. Studies on the enhanced production of extracellular lipase by *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 52, p. 315–320, 2006.

KALIL, S.J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539-550, 2000.

KARRA-CHÂABOUNI, M.; GHAMGUI, H.; BEZZINE, S.; REKIK, A.; GARGOURI, Y. Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1692–1698, 2006.

KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response surfaces. Design and analyses**. New York: Marcel Dekker Incorporated, 1987.

KLIBANOV, A.M. Enzymes: Nature's chemical machines. **Technology review**, v. 86, p. 40-48, 1983a.

KLIBANOV, A.M. Immobilized enzymes and cells as practical catalysts. **Science**, v. 219, p. 722-727, 1983b.

KOELLER, K.M.; WONG C.H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, p. 232-240, 2001.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S.K.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38-44, 2005.

LECHNER, M.; MIRKL, H.; GIITZ, F. Lipase production of *Staphylococcus carnosus* in a dialysis fermentor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 345-349, 1998.

LECKBAND, D.; LANGER, R. An approach for the stable immobilization of proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 227-237, 1990.

LEVINSON, W.E.; KURTZMAN, C.P.; KUO, T.M. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 292–295, 2007.

LI, C.Y.; CHEN, S.J.; CHENG, C.Y.; CHEN, T.L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, p. 195-199, 2005.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D.A.; FONTANA, J.D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65-71, 2004.

LIN, E.S.; WANG, C.C.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98-102, 2006.

MAHADIK, N.D.; PUNTAMBEKAR, U.S.; BASTAWDE, K.B.; KHIRE, J.M.; GOKHALE, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 715-721, 2002.

MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; MORAIS, M.M.C.; MELO, E.H.M.; MORAIS, M.A.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 23-27, 2001.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; PESSELA, B.C.C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBÁN, J.M. Glyoxil agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 274-280, 2006.

MARCHESI, J.R.; SATO, T.; WEGHTMAN, A.J.; MARTIN, T.A.; FRY, J.C.; HION, S.J.; WADE, W.G. Design and evaluation of useful bacterium specific DNA primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p. 117-123, 1998.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; HORCHANI, H.; GARGOURI, Y. Involvement of Gly 311 residue on substrate discrimination, pH and temperature dependency of recombinant *Staphylococcus xylosus* lipase: A study with emulsified substrate. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 31-39, 2007.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUIB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 282-291, 2005.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996.

OH, B.C.; KIM, H.K.; LEE, J.K.; KANG, S.C.; OH, T.K. *Staphylococcus haemolyticus* lipase: biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 385-392, 1999.

PALOMO, J.M. Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. **Current Bioactive Compounds**, v. 4, p. 126-138, 2008.

PALOMO, J.M. Modulation of enzymes selectivity via immobilization. **Current Organic Synthesis**, v. 6, *in press*, 2009.

PALOMO, J.M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUI SAN J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzymatic production of (3S,4R)-(-)-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxopiperidin-3-carboxylic acid using a commercial preparation from *Candida Antarctica A*: the role of a contaminant esterase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, p. 2653-2659, 2002a.

PALOMO, J.M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUI SÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1-6, 2003a.

PALOMO, J.M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SÁN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279-286, 2002b.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUI SAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v. 1038, p. 267–273, 2004a.

PALOMO, J.M.; PEÑA, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; PISABARRO, A.G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RAMIREZ, L.; GUISAN, J.M. Solid phase handling of hydrophobins: A new tool to study lipases. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 204-210, 2003b.

PALOMO, J.M.; SEGURA, R.L.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PERNAS, M.; RUA, M.L.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 630-635, 2004b.

PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* a potencial producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, v. 92, p. 737-744, 2002.

PERNAS, M.A.; LÓPEZ, C.; RÚA, M.L.; HERMOSO, J. Influence of the conformational flexibility on the kinetics and dimerisation process of two *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **FEBS Letters**, v.501, p. 87-91, 2001.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri:Manole, 2005.

PRATUANGDEJKUL, J.; DHARMSTHITI, S. Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. **Microbiology Research**, v. 155, p. 95-100, 2000.

RANGANATHAN, S.V.; NARASIMHAN, S.L.; MUTHUKUMAR, K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3975-3981, 2008.

REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical and Biology**, v. 6, p. 145-150, 2002.

REETZ, M. T.; RÜGGERBERG, C. J.; DRÖGE, M. J.; QUAX, W. J. Immobilization of chiral enzyme inhibitors on solid supports by amide-forming coupling and olefin metathesis. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8465-8473, 2002.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos : Uma Estratégia Seqüencial de Planejamentos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

ROLLOF, J.; NORMARK, S. In vivo processing of *Staphylococcus aureus* lipase. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 1844-1847, 1992.

RUIZ-BARBA, J.L.; MALDONADO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. **Analytical Biochemistry**, v. 347, p. 333–335, 2005.

SALAZAR, L.; BERMUDEZ, J.L.; RAMÍREZ, C.; LLAMA, E.F.; SINISTERRA, J.V. Resolution of 3-naphthoxy-1,2-propanediol using *Candida antarctica* lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 3507-3514, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

SAYARIA, A.; AGREBIA, N.; JAOUAB, S.; GARGOURIA, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus simulans* lipase. **Biochimie**, v. 83, p. 863–871, 2001.

SCHRAG, J.D.; LI, Y.G.; CYGLER, M.; LANG, D.M.; BURGDORF, T.; HECHT, H.J.; SCHMID, R.; SCHOMBURG, D.; RYDEL, T.J.; OLIVER, J.D.; STRICKLAND, L.C.; DUNAWAY, C.M.; LARSON, S.B.; DAY, J.; MCPHERSON, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, p. 187-202, 1997.

SCOPES, R.K. **Protein Purification: Principles and Practice**. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1993.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627-662, 2001.

SHARMA, R.; SONI, S.K.; VOHRA, R.M.; GUPTA, L.K.; GUPTA J.K. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1075-1084, 2002.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 850–858, 1996.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SUGIHARA, A. e TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, p. 133-142, 2002.

SIMONS, J.W.F.A.; ADAMS, H.; COX, R.C.; DEKKER, N.; GÖTZ, F.; SLOTBOOM, A.J.; VERHEIJ, H.M. The lipase from *Staphylococcus aureus*. Expression in *Escherischia coli*, large-scale purification and comparison of substrate specificity to *Staphylococcus hyicus* lipase. **European Journal of Biochemistry**, v. 242, p. 760-769, 1996.

SIMONS, J.W.F.A.; van KAMPEN, M.D.; RIEL, S.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R.; VERHEIJ, H.M. Cloning, purification and characterisation of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*: Comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, p. 675-683, 1998.

SIMONS, J.W.F.A.; van KAMPEN, M.D.; UBARRETXENA-BELANDIA, I.; COX, C. dos SANTOS, C.M.A.; EGMOND, M.R.; VERHEIJ, H.M. Identification of a Calcium Binding Site in *Staphylococcus hyicus* Lipase: Generation of Calcium-Independent Variants. **Biochemistry**, v. 38, p. 2-10, 1999.

SOUZA, C.F.V.; FLÔRES, S.H.; AYUB, M.A.Z. Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1186-1192, 2006.

SUGIURA, M.; ISOBE, M. Comparative studies on the adsorption of lipase and various proteins at the air-water interface. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 397, p. 412-417, 1975.

TAIPA, M. A; LIEBETON, K.; COSTA, J. V.; CABRAL, J. M.; JAEGER, K.E. Lipase from *Chromobacterium viscosum*: biochemical characterization indicating homology to the lipase from *Pseudomonas glumae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1256, p. 396-402, 1995.

TALON, R.; DUBLET, N.; MONTEL, M.C.; CANTONNET, M. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. **Current Microbiology**, v. 30, p. 11-16, 1995.

TALON, R.; MANTEL, M.C.; BERDAGUE, J.L. Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 620-622, 1996.

TIESINGA, J.J.W.; van POUDEROYEN, G.; NARDINI, M.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. Structural Basis of Phospholipase Activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. **Journal of Molecular Biology**, v. 371, p. 447-456, 2007.

TISCHER, W. ; KASCHE, V. Immobilized enzymes: Crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v. 17, p. 326-335, 1999.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

Van KAMPEN, M.D.; ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F.; EGMOND, M.R. Cloning, purification and characterisation of *Staphylococcus warneri* lipase 2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1544, p. 229-241, 2001.

VILLEGAS, C.G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella oxytoca* NRTL B-199: Study of product inhibition. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. S102, 2007.

VOGEL, R.F.; GAIER, W.; HAMMES, W.P. Expression of the lipase gene from *Staphylococcus hyicus* in *Lactobacillus curvatus* Lc2-c. **FEMS Microbiology Letters**, v. 69, p. 289-292, 1990.

VOIT, H.; GÖTZ, F.; MERSMANN, A.B. Overproduction of lipase with *Staphylococcus carnosus* (pLipPS 1) under modified gravity in a centrifugal field bioreactor. **Chemical Engineering and Technology**, v. 12, p. 364-373, 1989.

VOIT, H.; WENZIG, E.; MERSMANN, A.B. Production of a microbial lipase by *Staphylococcus carnosus* (pLipMut 2) in a bubble column reactor and a centrifugal field bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 221-226, 1991.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K.C.; SHEN, G.J.; WANG, H.Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain, A30-1 (ATCC 53841). **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 79, p. 433-438, 1995.

XU, X. Engineering of enzymatic reactions and reactors for lipid modification and synthesis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 289-304, 2003.

YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 91-96, 2007.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2095-2103, 2005.

ZHENG, Z.M.; HU, Q.L.; HAO, J.; XU, F.; GUO, N.N.; SUN, Y.; LIU, D.H. Statistical optimization of culture conditions for 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* AC 15 via central composite design. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1052-1056, 2008.

Capítulo IX - APÊNDICES

APÊNDICE 1 – RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NOS MANUSCRITOS

1. Seleção de microrganismos produtores de lipases

Este primeiro anexo trás a parte inicial deste trabalho de Doutorado, e se refere a primeira tentativa de selecionar microrganismos com atividade lipolítica. Nesta etapa foram selecionadas cepas produtoras de lipase, capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono para o seu crescimento. Foram estudados microrganismos isolados da região amazônica, e experimentos de seleção destes, e de condições de cultivo foram determinadas. As linhagens de microrganismos utilizados fazem parte de uma coleção de oitenta e quatro cepas, isoladas em ambientes da bacia amazônica e foram identificadas como *Bacillus*.

Esta etapa gerou um trabalho completo publicado no XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), principal congresso brasileiro da área, e está apresentado a seguir.

Apesar dos resultados obtidos com estes isolados serem extremamente interessantes, os trabalhos com estes isolados foram suspensos em virtude de algumas dificuldades apresentadas:

- Estes isolados apresentaram crescimento consideravelmente mais lento que outros isolados produtores de lipases estudados anteriormente no grupo.

- A atividade lipolítica apresentada por estes isolados também foi consideravelmente inferior que o obtido em trabalhos anteriores do grupo, usando isolados de ambientes contaminados com gordura.

- Estes isolados apresentaram uma atividade proteolítica muito alta, a produção destas enzimas (proteases), se torna um problema na armazenagem da enzima de interesse (lipases).

Aproveitamento de Glicerol para Produção de Lipase por *Bacillus* spp.

BL74 Isolado de Ambientes Amazônicos

Giandra Volpato¹, Deise Caron¹, Daniel Bezerra Machado¹, Rafael Costa Rodrigues¹, Júlio Xandro Heck², Marco Antônio Záchia Ayub¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos; Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090 – 91501-970, Porto Alegre – RS – E-mail: giandra@enq.ufrgs.br.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Escola Técnica; Rua Ramiro Barcelos, 2777, 90035-007, Porto Alegre – RS.

RESUMO

A aplicação industrial de enzimas lipolíticas tem sido muito estudada devido, principalmente, a capacidade destas enzimas de catalisar reações de síntese e sua estabilidade em diversos solventes orgânicos. Uma possibilidade é a utilização de lipase na síntese de biodiesel, tendo como vantagens a não geração de resíduos e a fácil recuperação do glicerol. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de cultivo para produção de lipase através do cultivo sobre glicerol de um *Bacillus* spp. isolado da Amazônia. O estudo das condições de cultivo foi realizado através de um delineamento experimental Plackett-Burman. As condições estudadas foram: concentração de óleo de soja e oliva, triton X-100, goma arábica, glicerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH, temperatura e concentração de inóculo. O melhor resultado encontrado foi de 25 U.L⁻¹. A temperatura apresentou efeito positivo na produção de lipase, e as demais variáveis, com exceção do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que não apresentou efeito significativo, apresentaram efeitos negativos ($p < 0,05$).

INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC. 3.1.1.3) são enzimas classificadas como hidrolases que catalisam a hidrólise de gorduras produzindo monoacilgliceróis, diacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (Ellaiah et al.,

2004). Possuem propriedades características, como especificidade, sendo esta um fator crucial para aplicação industrial e habilidade para catalisar reações em sistemas solúveis e insolúveis em água. A diferença para as esterases clássicas é que seus substratos naturais são insolúveis em água e sua atividade é máxima quando a enzima esta adsorvida na interface óleo-água (Ghosh et al., 1996).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As enzimas microbianas são mais interessantes, pois apresentam ampla aplicação industrial, como na indústria de alimentos, farmacêutica, detergentes, têxtil, biodiesel, cosmética, na síntese química, agroquímica e de materiais poliméricos (Hasan *et al.*, 2006; Jaeger & Eggert, 2002). Cada aplicação requer propriedades enzimáticas únicas, como especificidade, estabilidade, temperatura e pH, ou habilidade para catalisar reações de síntese na presença de solventes orgânicos. Entretanto, a busca e seleção de microrganismos com atividades lipolíticas pode facilitar a descoberta de novas lipases (Kumar *et al.*, 2005).

Várias fontes de carbono, como extrato de levedura, óleos comestíveis, como de oliva, de soja, de seda, de gergelim, de coco e de milho têm sido usados para produzir lipases por bactérias em cultivos submersos (Li *et al.*, 2005; Burkert *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2001; Hemachander *et al.*, 2001; Pratuangdejkul & Dharmstithi, 1999; Chen *et al.*, 1999). Porém, poucas investigações têm sido realizadas utilizando glicerol como substrato para produção de lipases (Lin *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2004). Portanto, este estudo vem a ser muito interessante, uma vez que o glicerol se tornará um subproduto excedente quando o biodiesel for produzido em larga escala comercial (Papanikolaou *et al.*, 2002).

A seleção dos fatores que influenciam nas condições de cultivo para produção de enzimas é um passo importante para futura aplicação comercial e envolve o estudo de parâmetros físico-químicos como, composição do meio de cultivo, seleção das fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e densidade ótica do inóculo (Gupta *et al.*, 2004). Atualmente, o uso de

ferramentas estatísticas, como delineamentos de Plackett-Burman (P-B) têm sido amplamente utilizados para seleção dos parâmetros mais importantes através de um número mínimo de experimentos (Kalil *et al.*, 2000).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi identificar os principais parâmetros para produção de lipase através do cultivo sobre glicerol de um *Bacillus* spp. isolado da Amazônia.

Palavras-chave: lipase, seleção de microrganismos, glicerol.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos e condições de crescimento

As oitenta e quatro cepas usadas neste estudo foram identificadas como *Bacillus*, pelo Laboratório do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estas cepas foram isoladas de amostras do solo e água da região Amazônica. Estas estavam mantidas congeladas em glicerol, e foram cultivadas em meio LB (10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl), com pH inicial ajustado para 7 e cultivadas em incubadora orbital rotatória com rotação de 150 rpm, a 37°C, por 24 h. As cepas pré-selecionadas foram mantidas em ágar LB a 4 °C.

Seleção das cepas produtoras de lipase

Dois métodos foram utilizados para seleção das cepas com atividade lipolítica. Primeiramente foi realizada uma pré-seleção em meio sólido e as cepas pré-selecionadas foram avaliadas em um meio líquido utilizando microplacas. As oitenta e quatro cepas de *Bacillus* depois de cultivadas foram testadas para produção de atividade lipolítica em ágar tributirina (10 g/L de tributirina neutra, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 15 g/L de ágar bacteriológico). Em cada placa foram depositados 10 µL de cada cultura e este procedimento foi realizado em duplicata, tendo sido uma lipase comercial usada como controle positivo. As placas foram incubadas a 37 °C por até 72 h,

a produção de lipase foi identificada pela presença de um halo translúcido em torno das colônias (Souza *et al.*, 2003).

As cepas que apresentaram as maiores formações de halo em ágar tributirina foram pré-inoculadas em meio LB por 18 h. Os cultivos foram realizados em tubos de ensaio de 60 mL, o meio LB foi suplementado com 100 g/L de óleo de oliva, utilizado como agente indutor da atividade lipolítica, emulsificados com 10 g/L de goma arábica, em vortex, à velocidade máxima por 1,5 min. Os tempos de cultivo analisados foram 12, 24 e 48 h. As amostras foram centrifugadas a 3000 g, 4 °C, por 15 min, o sobrenadante foi removido para verificar a atividade lipolítica extracelular do extrato enzimático bruto. O método colorimétrico descrito por Winkler e Stuckmann (1979), foi adaptado para utilização em 96 microplacas (placa de Elisa). Foram incubados 180 µL de substrato, contendo 30 mg de p-nitrofenil palmitato (p-NPP), 10 mL de isopropanol e 90 mL de tris-HCl 50 mM pH 8, juntamente com 20 µL do extrato enzimático, a 37°C por 15 min. A absorbância foi medida a 410 nm, utilizando-se o SpectraMAX 250. O coeficiente de absorvidade molar do p-nitrofenol nestas condições foi de $10,093 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Produção de lipase em meios contendo glicerol como fonte de carbono

Através dos testes descritos acima foram selecionadas as cepas que apresentaram maior atividade lipolítica. Foram testados seis diferentes meios de cultivo, variando a fonte de carbono, fonte de nitrogênio (orgânico e inorgânico) e a fonte de sais minerais (extrato de levedura bruto e meio salino Bushnell-Haas). Meio 1: 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicerol. Meio 2: 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicose. Meio 3: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicerol. Meio 4: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicose. Meio 5: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bushnell-Haas, 10 g/L de glicerol. Meio 6: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bushnell-Haas, 10 g/L de glicose. Todos os meios tiveram pH inicial ajustado em 7.0. Os meios foram inoculados com 5 % (v/v) de pré inóculo (meio LB, 18 h de cultivo). Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de volume de meio, a

37 °C, 150 rpm, por 12 h e 24 h. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

Determinações analíticas

Amostras de 5 mL de meio de cultura foram centrifugadas a 3500 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante livre de células foi utilizado para estimativa das atividades enzimáticas e para determinação do pH usando um pHmetro de laboratório. A biomassa foi quantificada pela densidade óptica medida espectrofotometricamente a 600 nm.

A atividade lipolítica foi determinada usando p-NPP como substrato (Winkler e Stuckmann 1979). Um volume de 0,15 mL do extrato enzimático bruto foi misturado com 1,35 mL da solução de substrato e incubado a 37 °C por 15 min em banho-maria. Um controle contendo enzima inativada termicamente também foi incubado. A mistura foi centrifugada (14.000 g, 10 min, 10° C) e a absorbância foi medida espectrofotometricamente a 410 nm, utilizando um espectrofotômetro Amersham Biosciences, Ultrospec 3100 Pro. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de p-nitrofenol por min a 37 °C. Sobre as condições descritas o coeficiente de absorvidade molar do p-nitrofenol é $13,23 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. A atividade proteolítica foi determinada de acordo com método descrito por Sarath e colaboradores (1989), utilizando azocaseína como substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir a mudança em uma unidade de absorbância sobre as condições do método.

Seleção das condições de cultivo

Para determinar as condições de cultivo que tiveram efeito significativo na produção de lipase, um delineamento experimental P-B foi utilizado (Plackett e Burman, 1946). A matriz do delineamento está apresentada na Tabela 3. Neste trabalho, nove variáveis e duas variáveis inertes foram estudadas em doze experimentos. Cada linha representa um experimento, e cada coluna representa uma variável independente ou variável inerte. Todos os

experimentos foram realizados em triplicatas e a média foi calculada. A atividade lipolítica média obtida foi dada como resposta. Os resultados foram analisados com 48 h de cultivo. As variáveis que apresentaram diferença significativa na produção de lipase ($p < 0,05$) foram selecionadas. Em todos os experimentos um meio pré-selecionado contendo 10 g/L de peptona e 5 g/L de extrato de levedura bruto foi utilizado. As variáveis e níveis estudados foram: óleo de soja e óleo de oliva nas concentrações de 5 g/L e 20 g/L; Triton X-100, ausência e na concentração de 5 g/L; goma arábica, ausência e na concentração de 10 g/L; glicerol nas concentrações de 10 g/L e 30 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ausência e na concentração de 5 g/L; pH inicial, 5 e 8; temperatura, 25 °C e 37 °C; densidade do inóculo, 5 % (v/v) e 10 % (v/v).

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através de ANOVA com auxílio do *software* STATISTIC versão 7.0, a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Seleção das cepas produtoras de lipase

Trinta cepas, das oitenta e quatro estudadas, foram selecionadas quanto as suas atividades lipolíticas. A Tabela 1 mostra a intensidade dos halos formados em ágar tributirina pelas cepas pré-selecionadas neste teste e a atividade lipolítica destes isolados. Verifica-se que as cepas que apresentaram halos mais claros foram as que tiveram maior atividade lipolítica. O mesmo comportamento foi encontrado por Bhatnagar e colaboradores (2005), na seleção de halobactérias produtoras de lipase, estes dados corroborados indicam que embora este método seja qualitativo, ele pode ser considerado bastante confiável. Estes autores obtiveram máxima atividade lipolítica de 10,8 U/L, usando p-NPP como substrato. Entre as cepas pré-selecionadas em nosso trabalho, o isolado BL13 foi o que apresentou maior atividade lipolítica (22,5 U/L).

Foram realizados testes de médias para verificar estatisticamente a diferença entre as atividades lipolíticas obtidas em cada isolado, sendo que para as médias consideradas estatisticamente iguais, com nível de confiança de 95 %, foram usados índices iguais. As cepas que apresentaram maior atividade lipolítica foram selecionadas para a seleção dos meios de cultivo contendo glicerol, estas apresentaram índices A e B. Desta forma, nove cepas foram selecionadas, BL13, BL49, BL53, BL58, BL60, BL61, BL64, BL66 e BL74, conforme se verifica na Tabela 1.

Seleção dos meios contendo glicerol

Com o aumento evidente da produção de biodiesel, o glicerol, principal subproduto da síntese deste biocombustível, será um importante excedente que pode vir a ser utilizado como fonte de carbono em diversos processos biotecnológicos. Fazendo um balanço de massa verifica-se que para cada 1.000 Kg de biodiesel produzidos a partir de óleos vegetais, aproximadamente 100 Kg de glicerol serão gerados. Alguns trabalhos utilizando glicerol, e até mesmo glicerol residual, como substrato para produção de bioprodutos, podem ser encontrados na literatura. Gupta e colaboradores (2004) estudaram a indução da produção de lipase por diversas fontes de carbono, encontrando o glicerol como melhor indutor desta enzima. Papanikolaou e colaboradores (2002) utilizou em seus trabalhos glicerol residual para produção de ácido cítrico.

Neste trabalho foram selecionados microrganismos capazes de utilizar o glicerol como fonte de carbono, visando à utilização de um subproduto que em breve estará sendo gerado em grande quantidade. A Tabela 2 apresenta os resultados de atividade lipolítica para os isolados selecionados anteriormente, nos diferentes meios de cultivo. Nestes meios foi testada a fonte de carbono, onde as atividades lipolíticas em meios utilizando glicerol como fonte de carbono (meios 1, 3 e 5) foram comparadas com as obtidas em meios utilizando glicose como fonte de carbono (meios 2, 4 e 6). Também atividades foram testadas as fontes de nitrogênio (peptona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), e a fonte de minerais.

Tabela 1: Formação de halo em ágar tributirina e atividade lipolítica dos isolados amazônicos.

Isolado	Formação de halo em ágar tributirina	Atividade lipolítica volumétrica (U/L)
BL7	+	7,4 ± 0,2 ^{FG}
BL9	+	9,9 ± 0,2 ^{DEF}
BL10	+	10,3 ± 0 ^{DEF}
BL12	+	10,3 ± 0,4 ^{DEF}
BL13	++	22,5 ± 0,2 ^A
BL14	++	10,9 ± 0,3 ^{DE}
BL20	+	10,6 ± 0 ^{DEF}
BL21	+	10,3 ± 0 ^{DEF}
BL22	+	7,9 ± 0,5 ^{FG}
BL23	+	8,2 ± 0,1 ^{FG}
BL32	+	8,9 ± 0,4 ^{EF}
BL37	+	6,7 ± 0 ^F
BL38	++	11,3 ± 0,1 ^{DE}
BL48	++	10,9 ± 0,5 ^{DE}
BL49	++	14,0 ± 0 ^{BCD}
BL53	++	14,1 ± 0,2 ^{BCD}
BL58	++	14,1 ± 0,5 ^{BCD}
BL60	++	15,4 ± 0,3 ^{BC}
BL61	++	14,9 ± 0 ^{BC}
BL62	+	10,5 ± 0,2 ^{DEF}
BL63	++	12,7 ± 0,5 ^{CDE}
BL64	++	16,1 ± 0 ^B
BL65	++	12,9 ± 0 ^{CD}
BL66	++	15,8 ± 0,9 ^{BC}
BL70	++	11,7 ± 0,5 ^{DE}
BL71	+	10,8 ± 0,2 ^{DE}
BL74	++	15,5 ± 0 ^{BC}
BL77	++	11,5 ± 1,6 ^{DE}
BL84	++	11,9 ± 0,4 ^{DE}
BL86	++	12,4 ± 0,4 ^{CDE}

++: halo muito claro; +: halo claro. Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2: Atividade lipolítica das cepas pré-selecionadas nos diferentes meios estudados.

Isolado	Atividade lipolítica volumétrica (U/L)					
	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6
BL13	8,8 ± 0,9 ^E	8,1 ± 0,3 ^F	5,6 ± 0,2 ^{EF}	9,3 ± 1,0 ^{DE}	7,2 ± 0,7 ^{EF}	1,4 ± 0,1 ^G
BL49	6,9 ± 0,7 ^{EF}	4,1 ± 0,1 ^{EF}	2,5 ± 0,8 ^{FG}	2,1 ± 0,7 ^{FG}	3,3 ± 1,5 ^{EF}	1,7 ± 0,4 ^G
BL53	19,9 ± 1,1 ^C	19,5 ± 1,4 ^C	8,3 ± 1,6 ^E	11,1 ± 1,5 ^{DE}	12,8 ± 0,4 ^{DE}	2,8 ± 0,5 ^{FG}
BL58	8,3 ± 0,5 ^E	6,9 ± 0,1 ^{EF}	4,3 ± 0,7 ^{EF}	6,8 ± 0,4 ^{EF}	5,9 ± 0,8 ^{EF}	1,8 ± 0,1 ^G
BL60	8,1 ± 0,4 ^E	6,9 ± 0,3 ^{EF}	4,6 ± 0,8 ^{EF}	5,6 ± 0,3 ^{EF}	5,3 ± 0,5 ^{EF}	2,5 ± 0,8 ^{FG}
BL61	8,6 ± 0,7 ^E	10,4 ± 0,7 ^{DE}	3,9 ± 1,0 ^{EF}	5,9 ± 0,4 ^{EF}	6,4 ± 0,1 ^{EF}	1,0 ± 0,1 ^G
BL64	5,4 ± 0,4 ^{EF}	3,9 ± 0,6 ^{EF}	2,1 ± 0,7 ^{FG}	5,0 ± 0,2 ^{EF}	5,5 ± 0,5 ^{EF}	2,2 ± 0,3 ^{FG}
BL66	7,7 ± 0,9 ^E	36,2 ± 4,4 ^A	3,5 ± 1,5 ^{EF}	17,2 ± 2,4 ^C	5,1 ± 0,3 ^{EF}	1,5 ± 0,1 ^G
BL74	24,3 ± 2,3 ^B	18,0 ± 2,3 ^{CD}	6,6 ± 1,6 ^{EF}	10,8 ± 1,0 ^{DE}	14,3 ± 0,4 ^D	3,3 ± 0,6 ^{FG}

Letras distintas indicam diferenças entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Meio 1: 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicerol. Meio 2: 10 g/L de peptona, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicose. Meio 3: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicerol. Meio 4: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de extrato de levedura bruto, 10 g/L de glicose. Meio 5: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bushnell-Haas, 10 g/L de glicerol. Meio 6: 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Bushnell-Haas, 10 g/L de glicose.

Verifica-se pela Tabela 2, que a maior atividade lipolítica foi obtida pelo isolado BL66 no meio contendo glicose como substrato (meio 2), e o isolado BL74 apresentou a segunda maior atividade lipolítica (24,3 U/L) no meio contendo glicerol como substrato (meio 1), indicando que o glicerol induziu a produção de lipase por este microrganismo neste meio, pois comparando os resultados de atividade lipolítica obtidos nos meio 3 e 4, verifica-se que aparentemente o glicerol inibiu a produção de lipase. Lin e colaboradores (2006) e Gupta e colaboradores (2004), trabalhando com *Antrodia cinnamomea* e *Bacillus* sp, respectivamente, também descreveram a indução desta enzima por glicerol. Observa-se ainda, que a maioria dos isolados tiveram atividades lipolíticas mais altas no meio 1 (BL49, BL53, BL58, BL60, BL74), e em seguida pelo meio 2, indicando que a utilização de peptona como fonte de nitrogênio e extrato de levedura bruto, que também atua como fonte de minerais, é mais interessante para produção de lipase pelos isolados estudados, do que o uso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e do meio salino Bushnell-Haas. Com isso, o isolado BL74 foi

selecionado como bom produtor de lipase em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Seleção das melhores condições de cultivo

Um delineamento experimental Plackett-Burman (P-B) foi usado para avaliar as seguintes condições de cultivo: concentração de óleo de soja, óleo de oliva, Triton X-100, goma arábica, glicerol, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH inicial, temperatura e densidade ótica do inóculo, para a produção de lipase por *Bacillus* spp. BL74. A Tabela 3 apresenta o delineamento experimental P-B para 12 experimentos com dois níveis de concentração para cada variável, e a atividade lipolítica correspondente, a qual variou entre 1,3 e 25,6 U/L. Esta variação reflete a importância da seleção das variáveis para alcançar a maior produção de enzima. As variáveis estudadas e seus níveis foram escolhidos baseados na literatura (Gupta *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006). Embora a cinética de crescimento tenha sido seguida até 60 h de cultivo, as maiores atividades enzimáticas foram observadas com 48 h de cultivo. Isto pode ser devido a inativação da lipase pela alta presença de proteases nos cultivos, conforme pode ser verificado na Tabela 3. Portanto, os resultados apresentados foram obtidos em 48 h de cultivo.

A máxima atividade lipolítica obtida foi de 25,6 U/L quando todas as variáveis estavam fixadas nos seus níveis inferiores (óleo de soja, 5 g/L; óleo de oliva, 5 g/L; ausência de Triton X-100, goma arábica e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; glicerol, 10 g/L; pH inicial, 5,0; temperatura, 25 °C; e densidade do inóculo, 5 % (volume de inóculo/volume de meio). Lin e colaboradores (2006), trabalhando com *Antrodia cinnamomea*, obtiveram atividade lipolítica de 27 U/L utilizando glicerol (50 g/L) como fonte de carbono para a produção de lipase. Bhatnagar e colaboradores (2005), encontraram máxima atividade lipolítica de 45 U/L, trabalhando com pH 7,5 e temperatura na faixa de 35 a 40 °C, em cultura de halobactéria *Natronococcus* sp.

Tabela 3: Matrix do delineamento experimental Plackett-Burman com pH final, atividade lipolítica e proteolítica em 48 h de cultivo, para *Bacillus* spp. BL74.

Exp	Variáveis ^a /níveis ^b									pH final	Atividade lipolítica (U/L)	Atividade proteolítica (U/mL)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉			
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	7,38	6,63	3,68
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	7,01	11,94	70,79
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	5,20	6,33	2,46
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	5,03	5,39	0,97
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	6,87	1,41	105,71
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	5,11	7,15	0,19
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	6,83	3,28	3,44
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	7,41	3,61	0,28
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	7,02	20,84	65,22
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	5,58	1,29	59,56
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	7,36	17,39	88,08
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,01	25,64	58,54

^a X₁ óleo de soja: (-) = 5 g/L, (+) = 20 g/L; X₂ óleo de oliva: (-) = 5 g/L, (+) = 20 g/L; X₃ Triton X-100: (-) = 0 g/L, (+) = 5 g/L; X₄ goma arábica: (-) = 0 g/L, (+) = 10 g/L; X₅ glicerol: (-) = 10 g/L, (+) = 30 g/L; X₆ (NH₄)₂SO₄: (-) = 0 g/L, (+) = 5 g/L; X₇ pH inicial: (-) = 5, (+) = 8; X₈ temperatura: (-) = 25 °C, (+) = 37 °C; X₉ densidade do inóculo (-) = 5 % (v/v), (+) = 10 % (v/v). ^b (-) nível inferior, (+) nível superior.

A Tabela 4 apresenta a análise estatística das variáveis estudadas na atividade lipolítica. Verifica-se que apenas a concentração de (NH₄)₂SO₄ não apresentou efeito significativo ao nível de confiança de 95 %. A principal observação feita pelo delineamento de Plackett-Burman, confirmado pelos efeitos negativos destas variáveis, foi a baixa indução da lipase pelos óleos vegetais. Este resultado contrasta com o reportado em vários estudos, que indicam que as lipases geralmente são fortemente induzidas por óleos (Kumar et al., 2005; Burkert et al., 2004; Hemachander et al., 2001). Verifica-se que o glicerol também teve efeito negativo na produção de lipase, indicando que sua concentração deve ser fixada no nível inferior (10 g/L).

A fonte de nitrogênio também é um fator importante para produção de lipase. Em nosso estudo, a adição de uma fonte de nitrogênio inorgânica, (NH₄)₂SO₄, (X6) não apresentou efeito significativo na atividade proteolítica

(dados não mostrados). Este resultado foi contrário ao obtido por Chen e colaboradores (1999), que estudou a produção de lipase por *Acinetobacter radioresistens* em um meio contendo 10 g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 1 g/L de NH₄Cl como fontes de nitrogênio, onde o NH₄Cl foi adicionado para inibir a atividade proteolítica. Surpreendentemente, os componentes emulsificantes, Triton X-100 (X3) e goma arábica (X4), que foram adicionados com o objetivo de facilitar e manter os óleos emulsionados nos meios de cultivo apresentaram efeitos negativos na atividade lipolítica. Este resultado contradiz alguns trabalhos encontrados na literatura que consideram a emulsificação um procedimento essencial para promover o aumento da biodisponibilidade de lipídios para as células e um conseqüente aumento da atividade lipolítica (Castro-Ochoa et al., 2005; Kumar et al., 2005).

Com estes resultados, foi possível selecionar as variáveis mais importantes na produção de lipase por *Bacillus* spp. BL74, e inclusive, o delineamento experimental P-B permitiu também a seleção dos níveis, sugerindo que as condições de cultivo para obtenção da maior atividade lipolítica pode vir a ser: 5 g/L de óleo de soja, 5 g/L de óleo de oliva, 10 g/L de glicerol, pH inicial de 5, densidade do inóculo de 5%, temperatura de 37 °C. O planejamento P-B é exploratório, ou seja, ele apenas indica as variáveis e sugere os valores dos níveis a serem estudados para obtenção das condições ótimas de cultivo. Estas variáveis devem ser estudadas em um delineamento composto central rotacional (DCCR), onde os pontos centrais podem ser os níveis selecionados no delineamento P-B.

Tabela 4: Efeitos estimados para atividade lipolítica e nível de significância dos parâmetros estudados no delineamento experimental P-B.

Fatores	Atividade lipolítica	
	Efeitos	p
Media/Interação	9,1027	<0,0001
(X ₁) óleo de soja	-7,1700	<0,0001
(X ₂) óleo de oliva	-2,6055	<0,0001
(X ₃) triton X-100	-7,6403	<0,0001
(X ₄) goma arábica	-2,7063	<0,0001
(X ₅) glicerol	-4,8941	<0,0001
(X ₆) (NH ₄) ₂ SO ₄	0,0105	0,9778
(X ₇) pH inicial	-6,9895	<0,0001
(X ₈) Temperatura	4,0836	<0,0001
(X ₉) inoculo inóculo	-1,4214	0,0023

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a utilização do meio sólido usando ágar tributirina foi eficiente na seleção de microrganismos produtores de lipase. O delineamento experimental Plackett-Burman pode ser usado para selecionar as variáveis que mais influenciam na produção de lipase por *Bacillus* spp. BL74. Além disso, foi possível selecionar um microrganismo com alta atividade lipolítica em meio contendo glicerol como fonte de carbono. Este resultado demonstra que a busca e seleção de microrganismos com atividades lipolíticas pode facilitar a descoberta de novas lipases, com potencial de aproveitamento de um provável subproduto excedente, sendo este resultado extremamente importante do ponto de vista econômico, no que diz respeito a processos biotecnológicos, podendo ser utilizado para produção de bioprodutos com alto valor agregado, além de apresentar efeitos positivos do ponto de vista ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bhatnagar, T.; Boutaiba, S.; Hacene, H.; Cayol, J.L.; Fardeau, M.L.; Ollivier, B.; Barrati, J.C. (2005), Lipolytic activity from Halobacteria: Screening and hydrolase production. *FEMS Microbiol Lett.*, 248, 133-140.

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

Castro-Ochoa, L.D.; Rodríguez-Gómez, C.; Valerio-Alfaro, G.; Ros, R.O. (2005), Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microbial Technol.*, 37, 648-654.

Chen, J.Y.; Wen, C.M.; Chen, T.L. (1999), Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. *Biotechnol Bioeng.*, 62, 311-316.

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

Ghosh, R.K.; Saxena, R.K.; Gupta, R.; Yadav, R.P.; Davidson, W.S. (1996), Microbial lipases: production and applications. *Science Progress.*, 57, 79-119.

Gupta, N.; Mehra, G.; Gupta, R. (2004), A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett-Burman design and by response surface methodology. *Canadian J Microbiol.*, 50, 361-368.

Hasan, F.; Ali Shah, A.; Hameed, A. (2006), Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microbial Technol.*, 39, 235-251.

Hemachander, C.; Bose, N.; Puvanakrishnan, R. (2001), Whole cell immobilization of *Ralstonia pickettii* for lipase production. *Process Biochem.*, 36, 629-633.

Jaeger, K.E.; Eggert, T. (2002), Lipases for biotechnology. *Curr Opin Chem Biotechnol.*, 13, 390-397.

Kalil, S.J.; Maugeri, F.; Rodrigues, M.I. (2000), Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. *Process Biochem.*, 35, 539-550.

Kumar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S.K.; Gupta, R. (2005), Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41, 38-44.

Li, C.Y.; Chen, S.J.; Cheng, C.Y.; Chen T.L. (2005), Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase with repeated fed-batch culture. *Biochem Eng J.*, 25, 195-199.

Lin, E.S.; Wang, C.C.; Sung, S.C. (2006), Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microbial Technol.*, 39, 98-102.

Maia, M.M.D.; Heasley, A.; Morais, M.M.C.; Melo, E.H.M.; Morais, M.A.; Ledingham, W.M.; Lima Filho, J.L. (2001), Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. *Biores Technol.*, 76, 23-27.

Papanikolaou, S.; Muniglia, L.; Chevalot, I.; Aggelis, G.; Marc, I. (2002), *Yarrowia lipolytica* a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol.*, 92, 737-744.

Plackett, R.L.; Burman, J.P. (1946), The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305-325.

Pratuangdejkul, J.; Dharmsthiti, S. (1999), Purification and characterization of lipase from psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. *Microbiol Research*, 155, 95-100.

Sarath, G.; Motte, R.S.; Wagner, F.W. (1989), Proteases assay methods. In- Proteolytic enzymes: a practical approach, eds. R.J. Beyon, J.S. Bond. IRL, Oxford, p.259.

Sharma, R.; Soni, S.K.; Vohra, R.M.; Gupta, L.K.; Gupta J.K. (2002), Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. Process Biochem., 37, 1075-1084.

Souza, C.F.V.; Rosa, T.D.; Ayub, M.A.Z. (2003), Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano Cheese during manufacture and ripening. Brazilian J of Microbiol., 34, 260-266.

Winkler, U.K.; Stuckmann, M. (1979), Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J Bacteriol., 138, 663-670.

2. Seleção e identificação de microrganismos com atividade lipolítica

Em função das dificuldades apresentados pelos isolados amazônicos, foi estudada a produção de lipase por cinco microrganismos presentes no laboratório e com atividade lipolítica já descrita, duas cepas de *Staphylococcus* foram isoladas de efluentes ricos em gordura: uma identificada como EX17 isolado de um efluente frigorífico, e a outra identificada como CV2 isolado de efluente de queijos. Os demais microrganismos eram leveduras obtidas em bancos de cultura: *Candida tropicalis*, *Candida silvícola* e *Candida guilhermondii*.

Nesta etapa o isolado de *Staphylococcus*, EX17, foi selecionado como melhor produtor de lipase, logo todos os experimentos seguintes deste trabalho serão realizados com este isolado.

2.1. Identificação do microrganismo

O microrganismo selecionado foi previamente identificado por como *Staphylococcus caseolyticus*, através de testes bioquímicos realizados pelo Laboratório do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o estágio no exterior foi novamente identificado por testes de 16S rDNA, no *Centro de Investigaciones Biológicas* (CIB), do CSIC, Espanha.

2.1.1. Extração do DNA bacteriano

A extração do DNA do microrganismo foi realizada segundo a metodologia previamente descrita por Ruiz-Barba *et al.* (2005). O DNA precipitado foi resuspenso em um volume em 600 µL de solução de TE (10 mM de tris-HCl, pH 8,0; 1 mM de EDTA), contendo 10 mg/mL de lisozima (Sigma, Alemanha), e foi incubado durante 30 min. a 37 °C. Após esta incubação, as células foram rompidas mediante uma nova incubação nas mesmas condições descritas e a adição de 70 µL de SDS 10 % (p/v) e 10 µL de proteinase K (20 µg/mL) (Sigma, Alemanha). O DNA foi purificado mediante

duas extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Para precipitar o DNA cromossômico, se adicionaram dois volumes de etanol frio e se agitou até completa dissolução. O DNA apareceu imediatamente como um precipitado. Foi lavado com etanol 70% e se deixou secar naturalmente. O DNA foi dissolvido em tampão TE (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.1.2. Amplificação do DNA mediante PCR

A amplificação do DNA foi efetuada utilizando o par de oligonucleotídeos 63f e 1387r (CAGGCCTAACACATGCAAGTC e GGGCGGWGTGTACAAGGC) descrito anteriormente (MARCHESI *et al.*, 1998). Esta combinação gera um produto amplificado de 1,3 kb. A reação de PCR foi realizada em tubos de microcentrifuga de 0,2 mL com 25 µL de mistura de reação contendo, 1 µL do DNA extraído, 20 mM de tampão Tris-HCL pH 8,0, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxynucleoside trifosfato (dNTP), 1 µM de cada oligonucleotídeos, 1 U de enzima Taq DNA polimerase (AmpliTaqGold). A reação foi realizada em um Gene-Amp PCR System 2400 (Perkin–Elmer, USA) utilizando os seguintes ciclos: 10 min. a 95 °C, para ativação da enzima, seguido por 1 ciclo de 1 min. também a 95 °C, 1 min. a 50 °C, 1 min. a 72 °C, 30 ciclos de 1 min. a 95 °C. Os produtos amplificados foram verificados em um gel de agarose 0,7 %, e purificados através de de um kit QIAquick 250 (Qiagen, Alemanha).

2.1.3. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA foi realizado no Serviço de Sequenciamento do *Centro de Investigaciones Biológicas* de Madri (CIB, CSIC).

A sequencia 16S rDNA foi analisada na base de dados do Projeto Ribosoma (*Ribosomal Database Project-II*) (<http://rdp.cme.msu.edu>), e o microrganismo apresentou 100% de identidade com *Staphylococcus warneri*.

A sequencia obtida foi:

GACGTTAGCGGCGGANGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATAAGA
CTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATATTGAACC
GCATGGTTCAATAGTGAAAGGCGGCTTTGCTGTCACTTATAGATGGATCCG
CGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAG
CCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAAC
TCTGTTATCAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTGTGCACATCTTGACGG
TACCTGATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGG
CGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAANGCGAC
TTTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAG
GATTAGAT

3. Sequenciamento da lipase de 40 kDa de *S. warneri* EX17

O sequenciamento da lipase foi realizado no *Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa* (CBMSO), do CSIC de Madri.

Após a purificação da lipase de *S. warneri* EX17 em butil-Toyopearl, a proteína foi separada em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a coloração das bandas foi realizada através de impregnação com Comassie.

A banda de interesse foi recortada de forma manual minimizando a quantidade de gel e foi digerida *in-situ* manualmente com tripsina utilizando o protocolo descrito por Shevchenko *et al.* (1996). Uma alíquota de 0,5 µL do sobrenadante da digestão foi analisado diretamente em um espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF (Matriz-Assisted Laser Desorption Ionisation/Time-Of-Flight), modelo autoflex de Bruker equipado com refletor, empregando DHB (2,5-ácido dihidroxibenzoico) como matriz e uma superfície Anchor-Chip (Bruker) como amostrador. O espectro de massas obtido “impressão peptídica”

para a identificação da proteína nas bases de dados utilizando as ferramentas de busca (Mascot, Profund) acessíveis na red.

A seqüência obtida da lipase de 40 kDa de *S. warneri* EX17 na sua forma de preproenzima, com 711 aminoácidos está apresentada abaixo.

```

MIKLINSYFFESISEGNTYRGDFLKNNSKRQFSIRKFTIGVVS
IVAGITFFVSEHDVQAAEQSSHLSQESVLSHSPSDQDANVSSKESEIDKNINKVDD
AQSYSQQNEQQSSKAENKEIQKLTQAEQVEKQEQPASNQTANHSSKGPSINNQESHNK
QXPSDDKTPNTEPEKIEKVDNHNKRIQDQYQDKNKKVDNKQSNNSQLNQKEHPNSSNNK
QQKQRLDVKPQKDNQQLQSRNDVKEKLDNQPIEQKDTKQQSNNKSKDNTTSVKSHSQQ
HKPHSLKTQSHSTPGQKVNTNISTKPTQQQTTNQNIPKNTDEATIKSNQYKNKYPVW
LVHGFLGLVGDNAPALYPNYWGGTKFPVKKRLEKLGVDVHEASVGAFFSSNYDRAVELY
HYIKGGKVDYGAHAHAKTGHDYKGFYQGIMPDWEPGKKIHLIGHSMGGQTIRLLEHF
LRHGNQEEIDYQKAHGGEISPLFTGGKDNMISSITTLATPHNGTPAADKLGNTDFVKG
VFNRIGRLSGNKYSHIDLGFSQWGFKQRPDESIDYVYKRVANSKIWKTKQDSAVYDLTT
EGSEKLNQMTSLNPNIVYTSYTGLDHTGPLGNENPNIRQFFLFDLTSRLIGRDDNVN
VRKNDGIVPVSSSLFPTNQAAKTVGMTSPTTDKGIWQVKPVMNGWDHLDFVGLDATDY
KRIGEELSQFYLGIIINLIRIEDIDGIKH

```

Aminoácidos correspondentes: G-Glicina, A-Alanina, L-Leucina, V-Valina, I-Isoleucina, P-Prolina, F-Fenilalanina, S-Serina, T-Treonina, C-Cisteína, Y-Tirosina, N-Asparagina, Q-Glutamina, D-Ácido aspártico, E-Ácido glutâmico, R-Arginina, K-Lisina, H-Histidina, W-Triptofano, M-Metionina.

Fazendo uma busca em bancos de dados de proteínas (www.ncbi.nlm.nih.gov) verificou-se que até agora apenas quatro seqüências de lipases de *Staphylococcus warneri* foram depositadas, com números de acesso: BAD90560, BAD90561, BAD90562, BAD90565. A seqüência obtida neste trabalho apresenta 100 % de identidade com a lipase depositada com número de acesso BAD90562, porém nenhum trabalho de caracterização desta enzima foi publicado até o momento.