



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Jéssica Bravin Carmello dos Santos

**LIPASE “WHOLE-CELL” DE *Streptomyces clavuligerus*:
PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM MEIO
ORGÂNICO**

**SÃO CARLOS – SP
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

Jéssica Bravin Carmello dos Santos

**LIPASE “WHOLE-CELL” DE *Streptomyces clavuligerus*: PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO EM MEIO ORGÂNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, na área de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

Coorientadora: Profa. Dra. Rosineide Gomes da Silva Cruz

**SÃO CARLOS – SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)


S2371 Santos, Jéssica Bravin Carmello dos
Lipase "whole-cell" de Streptomyces clavuligerus :
produção, caracterização e aplicação em meio orgânico /
Jéssica Bravin Carmello dos Santos. -- São Carlos :
UFSCar, 2016.
88 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Lipase "whole-cell". 2. Streptomyces
clavuligerus. 3. Fermentação submersa. 4. Biorreator.
5. Hidrólise. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE JÉSSICA BRAVIN CARMELLO DOS SANTOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 25 DE AGOSTO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
Coorientadora, UFSCar



Alberto Colli Badino Junior
UFSCar



Alvaro de Baptista Neto
UNESP



Rafael Firmani Perna
UNIFAL

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos os amigos, colegas e professores que fizeram parte desta importante etapa para minha formação profissional, que tanto me ensinaram e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para meu crescimento pessoal.

Agradeço em especial ao meu orientador, prof. Dr. Paulo Tardioli, pela confiança no meu trabalho, pela compreensão, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

À minha co-orientadora, prof. Dra. Rosineide Cruz, agradeço pela disponibilidade e cooperação para a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Alberto Badino, pela doação do microrganismo utilizado nesta pesquisa e pelas relevantes contribuições para o desenvolvimento dessa tese. À Dra. Cristiane Farinas, da Embrapa Instrumentação/São Carlos, pelas sugestões para o aprimoramento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Universidade Federal de São Carlos e ao Departamento de Engenharia Química pela oportunidade de realizar este Doutorado. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Aos técnicos Amadeus, Alyne, Thiago e Thaís, pelo apoio e pela disponibilidade.

Aos colegas do DEQ – UFSCar, Renata Beraldo, Felipe, Milton, Vinícius Pires, Mateus, Gilson, Gabriel, Guilherme, Ana Isabel, Ana María. Em especial, aos amigos do Laboratório de Tecnologia Enzimática, Margarita, Mayerlenis, Laiane e Vinícius Vescovi pela amizade, pelo apoio e pela ajuda com os experimentos. Às amigas e “roommates” Renata Porto e Cristine, agradeço pela convivência, amizade e paciência.

Por fim, agradeço imensamente aos meus pais Sidemil e Carmen, meus maiores incentivadores, e ao meu esposo, Rafael, meu colega de profissão e parceiro de vida. Aos meus pais, agradeço pela compreensão, paciência, pelas palavras carinhosas nos momentos difíceis e pelos valiosos ensinamentos. Ao Rafa, agradeço pela paciência, pelo incentivo, pelos conselhos e pelas inúmeras demonstrações de amor e companheirismo nesses 4 anos de doutorado. Obrigada pelo apoio incondicional, fundamental para que eu concluísse mais essa etapa.

Resumo

Lipases associadas à célula têm se destacado como biocatalisadores economicamente vantajosos, pois são produzidas a baixo custo, dispensando etapas posteriores de recuperação ou purificação. Poucos estudos sobre lipase de *Streptomyces clavuligerus* relatam a produção da enzima extracelular, embora esta tenha sido, a princípio, considerada uma enzima associada à célula. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a produção de lipase associada à célula de *Streptomyces clavuligerus* (lipase “whole-cell”, *Sc*-WCL) por fermentação submersa, a caracterização bioquímica da enzima e sua aplicação na síntese de butirato de butila, um éster de aroma com importância industrial. As condições de cultivo em shaker e os parâmetros operacionais para cultivo em biorreator foram avaliados com o intuito de estabelecer um protocolo para a produção de *Sc*-WCL. As condições de cultivo de *S. clavuligerus* em shaker que resultaram em maior atividade hidrolítica de *Sc*-WCL (3.000 U.L⁻¹) foram: frasco aletado, ausência de glicerol no meio de produção, pH 6,8 e 28 °C. Os parâmetros operacionais em reator de bancada que resultaram em maior produtividade volumétrica de *Sc*-WCL (54 U.L⁻¹.h⁻¹) foram: agitação de 400 rpm e aeração de 1 vvm. A máxima produtividade volumétrica em biorreator operado nas condições selecionadas foi alcançada após 24 h de cultivo (52,5 U.L⁻¹.h⁻¹), enquanto que produtividade similar em shaker foi obtida somente após 48 h de cultivo (54,8 U.L⁻¹.h⁻¹). O potencial catalítico de *Sc*-WCL em reações de hidrólise foi comparável ao de preparações comerciais de lipase. *Sc*-WCL foi mais ativa a 60 °C e pH 10,7, e mais estável na faixa de 30 a 40 °C após 1 h de incubação a pH 10. Na síntese de butirato de butila catalisada pela *Sc*-WCL, as condições reacionais que resultaram em maior conversão (85%) foram: 5 g de *Sc*-WCL/ L, razão molar ácido graxo/álcool 1:1 em heptano e 8 h de reação. A estabilidade em pH alcalino e em meio orgânico (pelo menos em heptano e butanol), associada ao baixo custo, tornam a *Sc*-WCL atrativa em aplicações de interesse industrial, tais como, síntese de aromas, formulações de detergentes, hidrólise de óleos vegetais, dentre outras.

Palavras-chave: Lipase “whole-cell”; *Streptomyces clavuligerus*; Fermentação submersa; Biorreator; Hidrólise; Esterificação; Butirato de butila.

Abstract

Cell-associated lipases have been considered biocatalysts economically advantageous because they are produced at low cost, avoiding further recovery or purification steps. Few studies regarding *Streptomyces clavuligerus* lipase have reported the production of extracellular enzyme, although at first this had been considered a cell-associated enzyme. In this context, the aim of this work was the production of the cell-associated lipase from *Streptomyces clavuligerus* (whole-cell lipase, *Sc*-WCL) by submerged fermentation, the biochemical characterization of the enzyme and its use in the synthesis of butyl butyrate, an aroma ester with industrial importance. The culture conditions on rotary shaker and the operational parameters for cultivation in bioreactor were evaluated in order to establish a protocol for *Sc*-WCL production. The conditions for *S. clavuligerus* cultivation in rotary shaker that resulted in maximal hydrolytic activity of *Sc*-WCL (3,000 U.L⁻¹) were: baffled flask, free-glycerol production medium, pH 6.8 and 28 °C. The operational parameters in bench reactor that resulted in maximal volumetric productivity of *Sc*-WCL (54 U.L⁻¹.h⁻¹) were agitation of 400 rpm and aeration of 1 vvm. The maximal volumetric productivity in bioreactor operated under selected conditions (52.5 U.L⁻¹.h⁻¹) was reached after 24 h, while similar productivity in rotary shaker (54.8 U.L⁻¹.h⁻¹) was achieved only after 48 h fermentation. The catalytic potential of *Sc*-WCL in hydrolysis reactions was comparable to the commercial lipase preparations. *Sc*-WCL was more active at 60 °C and pH 10.7, and stable at 30-40 °C after 1 h incubation at pH 10. For butyl butyrate synthesis catalyzed by *Sc*-WCL, the reaction conditions that resulted in higher ester conversion (85%) were: 5 g of *Sc*-WCL/ L, molar ratio of fatty acid: alcohol 1:1 in heptane and 8 h reaction. The stability at alkaline pH and organic medium (leastwise in heptane and butanol), associated with the low cost, make *Sc*-WCL attractive in industrial applications, such as flavors synthesis, detergent formulations, hydrolysis of vegetable oils , among others.

Keywords: Whole-cell lipase; *Streptomyces clavuligerus*; Submerged fermentation; Bioreactor; ; Hydrolysis; Esterification; Butyl butyrate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1:** Representação das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise) catalisadas por lipases. _____ 6
- Figura 2.2:** Distribuição de trabalhos publicados com enzimas isoladas e catalisadores “whole-cell” em diferentes meios reacionais. _____ 14
- Figura 2.3:** Etapas dos processos com catálise química e com catálise enzimática para a produção de ésteres empregados na indústria de cosméticos. _____ 19
- Figura 3.1:** Procedimento experimental para cultivo em câmara incubadora rotativa _____ 27
- Figura 3.2:** Atividade hidrolítica em função do tempo de sonicação das células de *S. clavuligerus* em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 (suspensão celular DO ~ 2,0 mantida em banho de gelo). _____ 29
- Figura 3.3:** Atividade hidrolítica de lipase intracelular (A) e extracelular (B) em função do tempo de cultivo de *S. clavuligerus* a 28°C, pH 7,4 e 250 rpm. _____ 30
- Figura 3.4:** Perfil de crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064 a 28 °C, pH 7,4, 250 rpm na presença (●) e ausência (■) de óleo de soja. _____ 31
- Figura 3.5:** Atividade hidrolítica de lipase intracelular (A) e extracelular (B) em função do tempo de cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064 a 28°C, pH 7,4, 250 rpm com a etapa de inóculo contendo óleo de soja e sem a etapa de inóculo. _____ 32
- Figure 4.1:** Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 72 h fermentation of *Streptomyces clavuligerus* at 28 °C in conventional Erlenmeyer flasks (■) and baffled Erlenmeyer flasks (●) containing standard production media (SPM). Lipase hydrolytic activity of whole broth samples measured by p-NPP assay, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0), 37°C. Results expressed as triplicate means ± s.d. _____ 46
- Figure 4.2:** Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 36 h of cultivations of *S. clavuligerus* in baffled Erlenmeyer flasks (orbital shaker, pH 6.8, 28 °C): (■) PM-1, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour and 23.0 g.L⁻¹ soybean oil; (●) PM-2, 23.0 g.L⁻¹ soybean oil only; (▲) PM-3, 10.0 g.L⁻¹ glycerol, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour, and 23.0 g.L⁻¹ soybean oil. Hydrolytic activity was measured by p-NPP assay. Results are expressed as triplicate means ± s.d. _____ 48
- Figure 4.3:** Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 84 h of fermentation of *S. clavuligerus* in a bench reactor at 28 °C and pH 6.8, using production media with 10.0 g/L glycerol (■) and without glycerol (●). Experiments were performed in duplicate and hydrolytic activity was measured by p-NPP assay. _____ 50
- Figure 4.4:** Lipase productivities of *S. clavuligerus* cultivated at 28 °C and pH 6.8 in media with or without glycerol, in the stirred bioreactor or in baffled Erlenmeyer flasks. _____ 50
- Figure 4.5:** Pareto chart of standardized effects of aeration (Aer), agitation (Agit), and their interaction on *S. clavuligerus* lipase productivity at 28 °C and pH 6.8, for 120 h of cultivation. _____ 52

Figure 4.6: Effect of temperature on *Sc*-WCL hydrolytic activity (■) and stability for 1 h (□). Relative activity was measured by titrimetric assay using tributyrin as substrate, for different temperatures in the range 35-65 °C, with 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0). Residual activity was also measured by tributyrin assay at 37 °C, with 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0), after 1 h incubation at temperatures ranging between 30 and 60 °C, at pH 10.0. Results are expressed as triplicate means ± s.d. _____ 53

Figure 4.7: Effect of pH on *Sc*-WCL hydrolytic activity. Relative activity was measured at 37 °C using tributyrin as substrate, with 100 mM of different buffers: sodium phosphate buffer for pH 6.0, 7.0, 7.5, and 8.0; and carbonate-bicarbonate buffer for pH 9.2, 10.0, and 10.7. Results are expressed as triplicate means ± s.d. _____ 54

Figure 5.1: Stability of *Sc*-WCL towards 0.1 M butanol in heptane at 37 °C and 200 rpm. Initial enzyme concentration of 27.3 TBU/g *Sc*-WCL was taken as 100%. Results are shown as means of triplicate ± s.d. _____ 66

Figure 5.2: Effect of butyric acid/butanol molar ratio in the conversion of butyl butyrate synthesis. Reaction conditions: 6 h at 37 °C and 250 rpm stirring, 1.0 wt.% of *Sc*-WCL, heptane as diluent, and 1 g of molecular sieve. Results are expressed as means of triplicate ± s.d. _____ 67

Figure 5.3: Effect of biocatalyst loading on ester yield. Reaction mixtures (substrate molar ratio 1:1) containing 1 g of molecular sieve were incubated with *Sc*-WCL for 3 h at 37 °C and 250 rpm. Results are expressed as means of triplicate ± s.d. _____ 68

Figure 5.4: Profiles of conversion over time in the synthesis of butyl butyrate. Reaction conditions: molar ratio 1:1 (butyric acid:butanol in heptane), 37 °C, 250 rpm, 1 g of molecular sieve, with (■) 0.5 wt.% and (●) 1.0 wt.% *Sc*-WCL. _____ 69

Figure 5.5: Operational stability of *Sc*-WCL in the synthesis of butyl butyrate. Reaction conditions: 0.5 wt.% *Sc*-WCL, butyric acid/butanol molar ratio 1:1, 37 °C, 250 rpm, 1 g of molecular sieve, cycle time 3 h. _____ 70

LISTA DE TABELAS

Table 4.1: Variables and levels of the 2 ³ full factorial experimental design. _____	40
Table 4.2: Hydrolytic activities in samples from <i>S. clavuligerus</i> cultivation. _____	44
Table 4.3: 2 ³ factorial design matrix for screening of the effects of pH, temperature and carbon source on lipase production by <i>S. clavuligerus</i> . _____	47
Table 4.4: Estimated effects on lipase hydrolytic activity from the 2 ³ full factorial design ($\alpha=0.10$). _____	47
Table 4.5: Maximum productivity of <i>S. clavuligerus</i> lipase obtained for 120 h in bioreactor cultivations at 28 °C and pH 6.8, using standard production medium under different conditions of agitation and aeration. _____	51
Table 4.6: Hydrolytic and esterification activities of <i>Sc</i> -WCL towards short- and long-chain substrates. _____	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1: Fontes produtoras de lipase microbiana e suas principais características quanto ao processo fermentativo. _____	9
Quadro 2.2: Trabalhos recentes sobre lipase produzidas por <i>Streptomyces</i> . _____	12
Quadro 2.3: Aplicações das lipases nos diversos segmentos industriais. _____	13
Quadro 2.4: Ésteres de ácidos graxos usados como aromas de frutas na indústria alimentícia. _____	18
Quadro 3.1: Meio de reativação de Ortiz et al. (2007) com modificações. _____	25
Quadro 3.2: Composição do meio de cultura modificado para o crescimento do microrganismo e produção de lipase. _____	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
Aer	<i>Aeration</i>
Agit	<i>Agitation</i>
BSPs	<i>Biomass support particles</i>
C ₀	Concentração inicial
C	Concentração final
CCRD	<i>Central composite rotary design</i>
CoA	Coenzima A
DO	Densidade óptica
g	Força g
GC	<i>Gas chromatography</i>
kHz	Quilohertz
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Logaritmo negativo da constante de dissociação ácida
PM	<i>Production medium</i>
p-NPP	para-Nitrofenilpalmitato (<i>p-nitrophenylpalmitate</i>)
<i>S. clavuligerus</i>	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Sc-WCL	Lipase “whole-cell” de <i>Streptomyces clavuligerus</i> (<i>Whole-cell lipase from Streptomyces clavuligerus</i>)
SPM	<i>Standard production medium</i>
SPM-G	<i>Standard production medium without glycerol</i>
TBU	Unidade de tributirina (<i>Tributylin unit</i>)
U	Unidade enzimática (<i>Enzymatic unit</i>)
U _{est}	Unidade de esterificação (<i>Esterification unit</i>)
v/v	Volume/volume
vvm	Volume de ar por volume de meio, por minuto
wt.%	<i>Weight percentage</i>
w/v	<i>Weight/volume</i>

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução	1
1.1 Justificativa do trabalho	1
1.2 Objetivos	3
1.3 Organização da Tese	4
Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica	5
2.1 Lipases	5
2.1.1 Reações catalisadas por lipases	6
2.1.2 Produção de lipases	7
2.1.3 Produção de lipases por <i>Streptomyces</i>	10
2.1.4 Aplicação de lipases na indústria	12
2.2 Biocatalisadores “whole-cell”	13
2.2.1 Lipases “whole-cell”	16
2.3 Síntese de ésteres de ácidos graxos	17
2.3.1 Butirato de butila	20
2.4 Considerações finais	21
Capítulo 3 – Estabelecimento de um protocolo para a produção de lipase por <i>Streptomyces clavuligerus</i> em fermentação submersa - Estudos preliminares	23
3.1 Introdução	23
3.2 Materiais	24
3.2.1 Reagentes	24
3.2.2 Microrganismos	24
3.3 Métodos	24
3.3.1 Preparação do estoque de trabalho	24
3.3.2 Meios de cultura	25
<i>Meio de reativação</i>	25
<i>Meios de crescimento (inóculo) e produção</i>	26
3.3.3 Metodologia experimental para o cultivo de <i>S. clavuligerus</i>	26
3.3.4 Recuperação da lipase intracelular	27
3.3.5 Escolha da linhagem de <i>S. clavuligerus</i>	27
3.3.6 Curva de crescimento de <i>S. clavuligerus</i>	28
3.3.7 Influência da etapa de inóculo para a produção de lipase por <i>S. clavuligerus</i>	28
3.3.8 Atividade hidrolítica de lipase	28
3.4 Resultados e discussão	29

3.4.1	Recuperação da lipase intracelular	29
3.4.2	Escolha da linhagem de <i>S. clavuligerus</i>	30
3.4.3	Curva de crescimento de <i>S. clavuligerus</i> ATCC 27064	31
3.4.4	Influência da etapa de inóculo para a produção de lipase por <i>S. clavuligerus</i>	32
3.5	Conclusões	33

Capítulo 4 – Melhoria das condições de cultivo de <i>Streptomyces clavuligerus</i> para a produção de lipase e estudo das propriedades bioquímicas da lipase “whole-cell”		35
4.1	Introduction	37
4.2	Materials and methods	38
4.2.1	Materials	38
4.2.2	Culture media	38
4.2.5	Culture conditions for <i>S. clavuligerus</i> lipase production in Erlenmeyer flasks	40
	<i>Influence of Erlenmeyer flask type</i>	40
	<i>Effect of carbon source, pH and temperature on lipase production</i>	40
	<i>Influence of glycerol on <i>S. clavuligerus</i> lipase production</i>	41
4.2.6	Standard cultivation of <i>Streptomyces clavuligerus</i> in a bench reactor	41
4.2.7	Determination of operational parameters for <i>S. clavuligerus</i> lipase production in a bench reactor	41
	<i>Effect of aeration and agitation conditions</i>	41
4.2.8	Preparation of whole-cell lipase from <i>Streptomyces clavuligerus</i>	42
4.2.9	Enzyme activity measurement	42
4.2.10	Biochemical properties of Sc-WCL	43
	<i>Effect of temperature and pH on Sc-WCL activity and stability</i>	43
	<i>Substrate specificity of Sc-WCL in esterification and hydrolysis reactions</i>	43
4.3	Results and discussion	44
4.3.1	Location of <i>S. clavuligerus</i> lipase	44
4.3.2	Culture conditions for <i>S. clavuligerus</i> lipase production in Erlenmeyer flasks	45
	<i>Influence of Erlenmeyer flask type</i>	45
	<i>Effect of carbon source, pH and temperature on the <i>S. clavuligerus</i> lipase</i>	46
	<i>Influence of glycerol on lipase production by <i>S. clavuligerus</i></i>	48
4.3.3	Standard cultivation of <i>S. clavuligerus</i> in a bench reactor	49
4.3.4	Operational parameters for <i>S. clavuligerus</i> lipase production in the bench reactor	51
	<i>Effect of aeration and agitation conditions</i>	51
4.3.5	Preparation of whole-cell lipase from <i>S. clavuligerus</i> (Sc-WCL)	52
4.3.6	Biochemical properties of Sc-WCL	53
	<i>Effect of temperature and pH on Sc-WCL activity and stability</i>	53
	<i>Substrate specificity of Sc-WCL in esterification and hydrolysis reactions</i>	54

4.4 Conclusion	55
4.5 Acknowledgements	55
4.6 References	56
Capítulo 5 – Aplicação da lipase “whole-cell” de <i>Streptomyces clavuligerus</i> na síntese de butirato de butila	59
5.1 Introduction	61
5.2 Materials and methods	62
5.2.1 Materials	62
5.2.2 Cultivation of <i>S. clavuligerus</i> in a 5 L bioreactor and preparation of whole-cell lipase (<i>Sc</i> -WCL)	62
5.2.3 Activity measurement of <i>Sc</i> -WCL	63
5.2.4 Effect of solvents on <i>Sc</i> -WCL activity	63
5.2.5 Synthesis of butyl butyrate using <i>Sc</i> -WCL	64
5.2.6 GC analysis	65
5.3 Results and discussion	65
5.3.1 Effect of solvents on <i>Sc</i> -WCL activity	65
5.3.2 Synthesis of butyl butyrate catalyzed by <i>Sc</i> -WCL	66
<i>Effect of acid/alcohol molar ratio</i>	66
<i>Effect of biocatalyst loading</i>	67
<i>Progress of butyl butyrate synthesis</i>	68
<i>Reuse of <i>Sc</i>-WCL in repeated batches</i>	69
5.4 Conclusion	70
5.5 Acknowledgements	70
5.6 References	70
Capítulo 6 – Conclusões e Sugestões	74
6.1 Conclusões finais	74
6.2 Sugestões para trabalhos futuros	75
Referências bibliográficas	77
Apêndice 1: Curva-padrão para a determinação da concentração de butanol	88

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Justificativa do trabalho

Enzimas são catalisadores biológicos responsáveis por acelerar uma série de transformações químicas. Pesquisas científicas conduzidas ao longo dos anos têm revelado com precisão os mecanismos de atuação das enzimas, possibilitando o aumento de sua utilização em diversas indústrias e aplicações (KUMAR et al., 2014). As vantagens do uso de enzimas nos processos em larga escala estão relacionadas à alta especificidade destes catalisadores, às condições brandas de reação requeridas (pressão, temperatura e pH) e aos baixos impactos ambientais e toxicológicos devido à sua utilização. Atualmente, as enzimas são rotineiramente utilizadas nos setores alimentício, de detergentes, curtumes, farmacêutico, de cosméticos, de química fina (KUMAR et al., 2014).

Dentre as enzimas com potencial aplicação na indústria estão as lipases (EC 3.1.1.3) pertencentes à classe das hidrolases que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres na interface óleo-água. Além disso, catalisam, em meio orgânico, reações de transesterificação (alcoólise, acidólise e interesterificação) e esterificação (HASAN et al., 2006). Essas enzimas têm emergido como um dos principais biocatalisadores com comprovado potencial para contribuir com a multibilionária indústria biotecnológica e têm sido usadas no metabolismo lipídico *in situ* e em aplicações industriais *ex situ* (SHARMA E KANWAR, 2012).

A demanda por enzimas tem aumentado continuamente, impulsionada, principalmente, pela necessidade crescente por soluções sustentáveis (KUMAR et al., 2014). De acordo com pesquisas de mercado, a demanda global de enzimas deverá crescer a uma taxa de 6,9%, ou seja, de US\$ 5,8 bilhões para US\$ 11,3 bilhões entre os anos de 2010 a 2020 (KUMAR et al., 2014). Com relação às lipases, a projeção é de que o mercado global dessas enzimas movimentará US\$ 590,5 milhões em 2020 (MARKETSANDMARKETS, 2015). Os segmentos alimentício e de alimentação animal deverão ser os principais responsáveis pela demanda por lipases na indústria. Essa expansão no mercado de lipases tem sido encorajada, principalmente, pela crescente consciência sobre a saúde animal e aumento do consumo de carne e produtos lácteos modificados (MARKETSANDMARKETS, 2015).

As lipases podem ser extraídas de plantas e tecidos animais (THAKUR, 2012). No entanto, a principal fonte para obtenção dessas enzimas tem sido os microrganismos (DEMAIN E ADRIO, 2008). As bactérias frequentemente reportadas como produtoras potentes de lipases pertencem aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Staphylococcus*. Há alguns anos, a presença de lipases em meio de produção de antibióticos por bactérias do gênero *Streptomyces* tem sido relatada (KIM E PARK, 2007). Mais recentemente, estudos sobre lipase de *Streptomyces* têm reportado a produção, purificação e caracterização da enzima extracelular (MISHRA E GUPTA, 2014), embora a lipase de *Streptomyces* tenha sido, a princípio, considerada uma enzima associada à célula (LARGE, et al., 1999).

Para sua aplicação em larga escala, as lipases geralmente são imobilizadas por diferentes métodos, incluindo a ligação covalente, aprisionamento, *cross-linking* e adsorção em suportes hidrofóbicos, hidrofílicos e híbridos (CHRISTENSEN et al., 2003; GARCIA-GALAN et al., 2011; MENDES et al., 2013; LIMA et al., 2015). Essa estratégia apresenta uma série de vantagens, tais como: facilidade de reciclagem do biocatalisador, possibilidade de operação contínua, recuperação e purificação do produto, e aumento da estabilidade da enzima. As principais desvantagens podem ser o alto custo dos suportes, a perda de atividade devido à imobilização e limitação na difusão do substrato (MURTY et al., 2002).

Recentemente, as lipases associadas à célula têm se destacado como biocatalisadores economicamente vantajosos, pois são produzidas a baixo custo (TALUKDER et al., 2013; SOLARTE et al., 2014). A biomassa pode ser diretamente utilizada, sem que etapas de recuperação ou purificação sejam necessárias. Além disso, podem ser facilmente recuperadas após as reações, pois são lipases naturalmente imobilizadas (SOLARTE et al., 2014).

Diante do progressivo interesse na utilização industrial de lipases, das diferentes abordagens que vem sendo propostas com o intuito de superar os gargalos para sua aplicação em larga escala e considerando a imensa biodiversidade microbiana, justifica-se a busca por potenciais produtores de lipases, com propriedades bioquímicas atrativas e que viabilizem economicamente sua aplicação em escala industrial. Nesse contexto, a proposta deste trabalho foi estudar a produção de lipase por *Streptomyces clavuligerus* e avaliar a lipase associada à célula do microrganismo (“whole-cell”) como biocatalisador. Para tanto, buscou-se definir um protocolo de produção da enzima por meio da avaliação das condições

de cultivo (pH, temperatura, fonte de carbono) em shaker e dos parâmetros operacionais (agitação e aeração) em biorreator. Após a produção da enzima em meio de cultivo melhorado, investigou-se suas propriedades bioquímicas como pH e temperatura de maior atividade hidrolítica, estabilidade térmica e atividade de esterificação. Conhecendo as características da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus*, verificou-se a viabilidade de aplicação do biocatalisador na síntese em meio orgânico de butirato de butila, um éster de ácido graxo amplamente utilizado na indústria alimentícia. Portanto, este trabalho apresenta o desenvolvimento e a avaliação de um processo como um todo, desde a produção de um novo biocatalisador até seu potencial de aplicação em processos de biotransformação.

1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi apresentar um estudo sobre a produção de lipase por uma linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* e avaliar a lipase associada à célula do microrganismo (“whole-cell”) como biocatalisador, visando a sua aplicação em reações de biotransformação. Dentre os objetivos específicos, destacaram-se:

- Estudo da localização da atividade de lipase de *S. clavuligerus* (intra ou extracelular);
- Avaliação das condições de cultivo de *S. clavuligerus* em shaker para a produção de lipase, tais como: influência da etapa de crescimento (inóculo), tipo de frascos, fonte de carbono e influências de glicerol, pH e temperatura de incubação;
- Avaliação dos parâmetros operacionais para o cultivo de *S. clavuligerus* em reator em escala de bancada visando a produção de lipase, tais como: agitação e aeração.
- Estudo das propriedades bioquímicas da lipase associada à célula ou lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus*, sendo elas: pH e temperatura de maior atividade hidrolítica, estabilidade térmica, atividade de hidrólise frente a substratos de cadeia curta e de cadeia longa, atividade de esterificação na síntese de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia longa, estabilidade em heptano e butanol;
- Aplicação da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* na síntese de butirato de butila, avaliando os parâmetros: razão molar ácido graxo/álcool, quantidade de biocatalisador e número de bateladas repetidas (reciclo do biocatalisador).

1.3 Organização da Tese

O Capítulo 2 apresenta uma revisão da literatura acerca dos tópicos relacionados ao tema da tese. Considerações sobre as lipases e sua aplicação nos diversos setores industriais, o microrganismo *Streptomyces clavuligerus* e a produção de lipases, os catalisadores de célula inteira ou “whole-cell” com ênfase nas lipases de célula inteira ou lipases “whole-cell”, e a síntese de ésteres de ácidos graxos, em especial, do butirato de butila fazem parte deste capítulo.

Ensaio preliminares visando a seleção da linhagem de *Streptomyces clavuligerus*, selvagem ou mutante, e o estabelecimento de um protocolo de cultivo do microrganismo para produção de lipases são considerados no Capítulo 3. Constam ainda neste capítulo, as metodologias empregadas nos estudos e a discussão dos resultados.

Os estudos sobre localização da atividade de lipase de *S. clavuligerus* bem como sobre a melhoria das condições de cultivo do microrganismo e parâmetros operacionais para a produção de lipase em shaker e biorreator são apresentados no Capítulo 4. Ainda neste capítulo, são avaliadas as propriedades bioquímicas e o potencial catalítico da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* em reações de hidrólise e esterificação.

No Capítulo 5, destaca-se a aplicação da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* na síntese do éster butirato de butila. Dentre as condições estudadas, serão apresentadas a razão molar ácido graxo/álcool e a quantidade do biocatalisador que resultaram em maior conversão em éster de ácido graxo, além do número de ciclos da lipase “whole-cell” na síntese.

O Capítulo 6 apresenta as conclusões deste trabalho e as sugestões propostas para trabalhos futuros.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

2.1 Lipases

Lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interfase orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de óleos e gorduras com a liberação de ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Em meios com baixa concentração de água, as lipases catalisam reações de esterificação e transesterificação (GUPTA et al., 2015).

As lipases são amplamente encontradas na natureza, sendo produzidas por várias plantas, animais e microrganismos (THAKUR, 2012). Os fungos produtores de lipases pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* (SINGH E MUKHOPADHYAY, 2012). Dentre as leveduras, destacam-se as dos gêneros *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Lachancea*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Torulaspota* (ROMO-SANCHEZ et al., 2010). Algumas bactérias são importantes produtoras de lipases, especialmente as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (GUPTA et al., 2004).

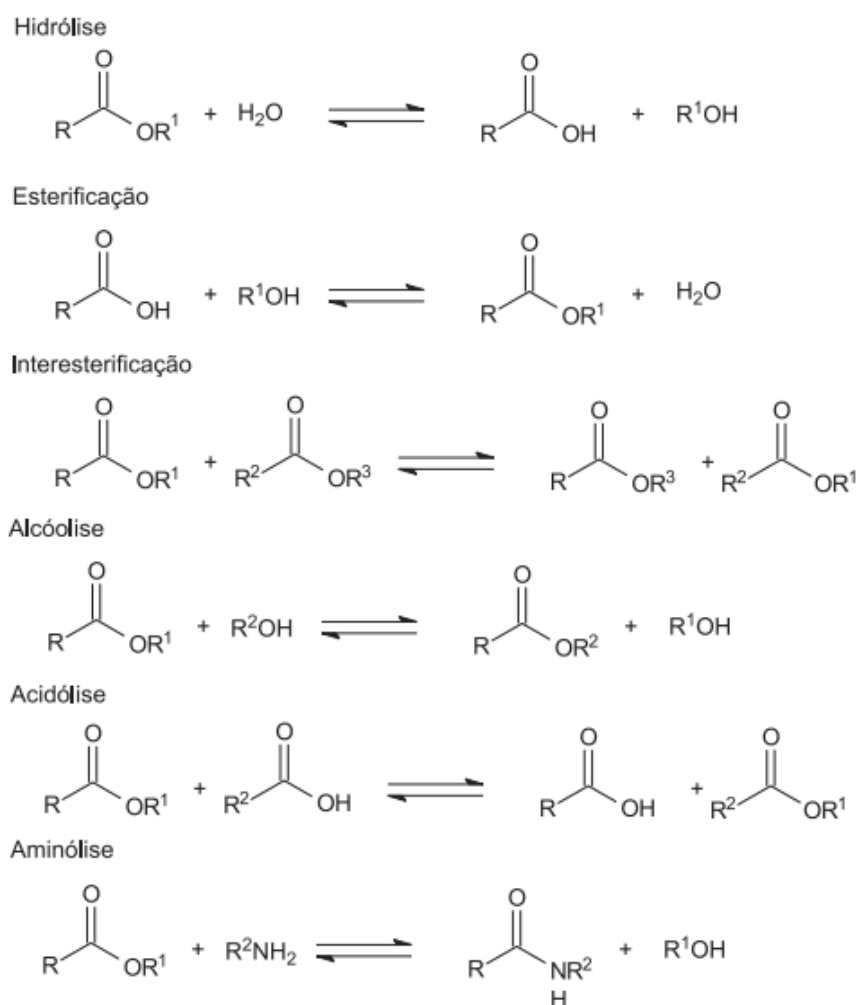
A determinação da estrutura das lipases foi realizada por meio de técnicas de cristalografia, em meios aquosos homogêneos, revelando que o sítio ativo é formado pela tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico (ou ácido glutâmico), sendo esta tríade frequentemente protegida na molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “*lid*” (BRADY et al., 1990; REIS et al., 2009).

As lipases são altamente ativas na presença de substratos de cadeia longa e, ao entrar em contato com esses substratos insolúveis, a “tampa” hidrofóbica que cobre o sítio ativo se movimenta, expondo-o, o que leva à catálise enzimática (NAGARAJAN, 2012). Este fenômeno é denominado como ativação interfacial e é único das lipases (SVENDSEN, 2000). A ativação interfacial foi inicialmente considerada como uma característica essencial típica para todas as lipases (BRZOZOWSKI et al., 1991). Posteriormente, estudos sobre a estrutura tridimensional de outras enzimas lipolíticas como as de *Candida antarctica* B e *Pseudomonas aeruginosa*, revelaram que a presença de uma “tampa” hidrofóbica não está necessariamente correlacionada com a ativação da lipase ou ao seu mecanismo catalítico (FERRATO et al., 1997; OLLIS et al., 1992; BRZOZOWSKI et al., 1991).

2.1.1 Reações catalisadas por lipases

Conforme mencionado anteriormente, além de catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, as lipases também são capazes de catalisar reações reversas, como por exemplo, a formação de ésteres, a partir de um álcool e ácido carboxílico com liberação de água, em um processo denominado esterificação (PAQUES e MACEDO, 2006). As reações de hidrólise e esterificação podem ainda ser combinadas em uma sequência resultando em reações denominadas de transesterificação, que dependendo dos reagentes de partida, são nomeadas como acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise (PAQUES e MACEDO, 2006) (Figura 2.1).

Figura 2.1: Representação das reações de hidrólise, esterificação e transesterificação (acidólise, alcoólise, interesterificação e aminólise) catalisadas por lipases.



Fonte: Adaptado de Paques e Macedo, 2006.

Lipases de diferentes origens podem apresentar diferentes especificidades, característica crucial para sua aplicação industrial. As lipases podem ser divididas em três grupos, baseados em sua especificidade (RIBEIRO et al., 2011): a) Lipases não-específicas (como aquelas produzidas por *Candida rugosa*, *Candida antarctica* B, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.), que clivam moléculas de triacilglicerol gerando, aleatoriamente, ácidos graxos livres e glicerol, bem como mono- e diglicerídeos como intermediários; b) Lipases 1, 3-específicas (como as de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizopus niveus*, *Penicillium roquefortii* e a lipase pancreática), que liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 de um triglicerídeo, resultando em produtos com composições diferentes daqueles obtidos por lipases não-regiosseletivas; (MACRAE e HAMMOND, 1985; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MENDES et al., 2012) e c) Lipases ácido graxo-específicas, que atuam somente na hidrólise de ésteres de ácido graxos de cadeia longa com dupla ligação na posição *cis* do carbono 9. É um tipo pouco comum de especificidade entre as lipases, sendo a lipase de *Geotrichum candidum* o exemplo mais estudado (CASTRO et al., 2004; UHLIG, 1998; MEIRELLES, 1997).

As lipases também podem ser estereoespecíficas, atuando preferencialmente na hidrólise de um dos isômeros de uma mistura racêmica ou mesmo catalisando a formação seletiva do isômero *R*- ou *S*- (RIBEIRO, 2011). Alguns exemplos são as lipases de *Candida antarctica* (PALOMO et al., 2002) e de *Bacillus cereus* (CHEN et al., 2007).

2.1.2 Produção de lipases

As lipases podem ser produzidas pelo cultivo de microrganismos, ou obtidas por extração de tecidos de plantas ou eucariotos superiores.

As lipases de origem animal, obtidas de pâncreas de porco ou humano, estão entre as lipases mais conhecidas e investigadas. Em animais, as lipases estão comprometidas com várias etapas do metabolismo de lipídeos, como na digestão de gorduras, absorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas (RIBEIRO et al. 2011).

As lipases de origem vegetal são obtidas das sementes de plantas superiores, como a mamona e a canola, e também são encontradas em tecidos de reserva de energia das plantas (RIBEIRO et al. 2011; SANTOS et al., 2013).

As lipases microbianas, obtidas pelo cultivo de fungos, leveduras ou bactérias, são as mais utilizadas industrialmente. A preferência pelos microrganismos como fonte de lipases, ou enzimas em geral, se deve ao menor tempo de fermentação visando à produção do biocatalisador, ao alto rendimento da conversão de substrato em produto, à grande versatilidade em relação às condições ambientais, e à simplicidade na manipulação genética ou nas condições de cultivo (RIBEIRO et al. 2011).

Devido à pluralidade do meio natural, os microrganismos geralmente produzem lipases com diferentes características bioquímicas, como especificidade em relação à utilização do substrato, pH e temperatura ótimos. Dentre todos os microrganismos, a levedura *Candida rugosa* é a mais empregada na produção de lipases industriais (FREIRE E CASTILHO, 2008).

A quantidade de lipase produzida por um microrganismo é dependente de vários fatores ambientais, tais como temperatura, pH, idade da cultura, tamanho do inóculo, fonte de carbono, proporção carbono-nitrogênio, fonte de lipídeos, agitação, e concentração de oxigênio dissolvido no meio de produção. Uma vez que a produção de lipases microbianas é induzida pela presença de lipídeos na natureza, a utilização de fontes de carbono lipídicas tem sido relatada com o intuito de aumentar a quantidade de lipase produzida em meios de cultivo (DEIVE et al. 2009; D'ANNIBALE et al., 2006). No Quadro 2.1 são apresentados alguns microrganismos produtores de lipases, bem como algumas características do processo fermentativo.

Diferentes processos de produção de lipase por fermentação submersa incluem produção em batelada (BUSSAMARA et al., 2010), batelada repetida (SHOW et al., 2012), batelada alimentada (FICKERS et al., 2009), e produção contínua (MONTESINOS et al., 2003). No caso da produção de lipases por fungos, o processo mais utilizado é a fermentação em estado sólido usando substratos de baixo custo, em geral, resíduos agroindustriais, como farelo de soja e casca de arroz (COLLA et al., 2010), e bagaço de oleaginosas e farelo de trigo (MALA et al., 2007; SILVEIRA et al., 2016).

Quadro 2.1: Fontes produtoras de lipase microbiana e suas principais características quanto ao processo fermentativo.

Microrganismo	Tipo de fermentação	Principais nutrientes	Máxima atividade (tempo de fermentação)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Submersa	Azeite de oliva e Sacarose	29,6 U.mL ⁻¹ (120 h)	Macris et al., 1996
<i>Aspergillus niger</i>	Estado sólido	Resíduo de óleo de palma	15,4 U.mL ⁻¹ (72 h)	Silveira et al., 2016
<i>Candida rugosa</i>	Submersa	Ácido palmítico	5,3 U.mL ⁻¹ (48 h)	Dalmau et al., 2000
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> YN	Submersa	Azeite de oliva	0,1 U.mL ⁻¹ (24 h)	Abdel-Fattah, 2002
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	Submersa	Tripticaséna (Soja)	0,2 U.mL ⁻¹ (72 h)	Dominguez et al., 2005
<i>Penicillium</i> sp.	Submersa	Azeite de oliva	21,0 U.mL ⁻¹ (120 h)	Wolski et al., 2008
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Estado sólido	Torta de babaçu	90,0 U.g ⁻¹ (72 h)	Gutarra et al., 2009
<i>Bacillus subtilis</i> OCR-4	Estado sólido	Resíduo (óleo de amendoim)	4,5 U.g ⁻¹ (48 h)	Singh et al., 2010
<i>Burkholderia cepacia</i> LTEB11	Estado sólido	Bagaço de cana de açúcar e farinha de semente de girassol	234,0 U.g ⁻¹ (96 h)	Salum et al., 2010
<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 3562	Estado sólido	Óleo de coco	96,2 U.g ⁻¹ (115 h)	Garlapati et al., 2010
<i>Rhizopus delemar</i>	Submersa	Óleo de girassol e Tween-80	0,5 U.mL ⁻¹ (120 h)	Açikel et al., 2011
<i>Streptomyces exfoliates</i> LP10	Submersa	Tributirina, glicose e Tween-80	7,6 U.mL ⁻¹ (120 h)	Aly et al., 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> AAU2	Submersa	JSC ^a e Tween-80	4,9 U.mL ⁻¹ (60 h)	Bose e Keharia, 2013
<i>Geotrichum candidum</i>	Submersa	Óleo de algodão	22,9 U.mL ⁻¹ (48 h)	Ramos et al., 2015
<i>Streptomyces</i> sp. TEM 33	Submersa/ Estado sólido	Azeite de oliva e Tween-80	1,7 U.g ⁻¹ (144 h) ^b	Cadirci et al., 2016
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> DA2	Submersa	Gordura residual de restaurantes	248,1 U.mL ⁻¹ (48 h)	Fotouh et al., 2016

^a JSC = Jatropha seedcake. O óleo das espécies de *Jatropha* (planta) é usado para a produção de biodiesel. O resíduo gerado (*Jatropha* seedcake) tem alta toxicidade, sendo um problema ambiental para os setores de produção de biodiesel.

^b Atividade hidrolítica obtida na fermentação em estado sólido.

Fonte: Elaborado pela autora.

As lipases microbianas são usualmente secretadas no meio de cultivo (enzimas extracelulares), podendo ainda manter-se associadas às células, seja alojadas em seu interior (enzimas intracelulares) ou ligadas à membrana (NAJJAR et al., 2011; JERMSUNTIEA et al., 2011; HAM et al., 2010). As lipases extracelulares são preferencialmente estudadas e mais comumente reportadas na literatura devido à sua recuperação, purificação e imobilização. No entanto, ao longo dos últimos anos, pesquisas que visam à utilização das lipases intracelulares em reações de biotransformação têm se intensificado, como uma estratégia para reduzir os custos de obtenção dos biocatalisadores e viabilizar a aplicação de lipases em escala industrial (SOLARTE et al., 2014).

2.1.3 Produção de lipases por *Streptomyces*

A produção de lipases por *Streptomyces* está diretamente relacionada à síntese de antibióticos, principal função desempenhada por essas bactérias (DORAN et al., 1990). A indução de lipases ocorre devido à presença de fontes de carbono lipídicas nos meios de produção de antibióticos (LARGE et al., 1999).

Os óleos são considerados componentes essenciais para a produção de antibióticos, pois possuem naturalmente propriedades antiespumantes e são fontes de carbono mais baratas que os carboidratos (LARGE et al., 1999). Além disso, a presença de fontes lipídicas, conforme reportado na literatura, aumenta a produção de metabólitos secundários em meios de cultivo utilizando *Streptomyces* (PARK et al., 1994; LEE E HO, 1996; CHOI et al., 1996).

As lipases estão envolvidas no catabolismo de óleos, catalisando a primeira reação enzimática de quebra dos lipídeos presentes na composição dos meios de cultivo de *Streptomyces*. Sua função específica de quebra de tri-, di- e monoglicerídeos pode estar ligada ao papel de importar ácidos graxos para dentro das células (BERK, 1996). No interior das células, os ácidos graxos entram no ciclo de β -oxidação para liberar acetil- ou propionil-coenzima A (CoA), dependendo da composição da cadeia carbônica do substrato lipídico, que são precursores para a formação de muitos antibióticos (LARGE et al., 1999).

A atividade hidrolítica de lipase tem sido frequentemente relatada em trabalhos sobre produção de antibióticos por *Streptomyces clavuligerus* (LARGE et al., 1998; ORTIZ et al., 2007; KIM E PARK, 2007). O microrganismo *Streptomyces clavuligerus* foi primeiramente reportado por Higgins e Kastner (1971). Em seu estudo, os pesquisadores relataram que a nova espécie, isolada a partir de uma amostra de solo da América do Sul,

produzia cefalosporinas, um grupo de antibióticos beta-lactâmicos usado no tratamento de infecções bacterianas.

Streptomyces clavuligerus é uma bactéria aeróbia e filamentosa, gram-positiva e não-patogênica, capaz de produzir mais de 20 metabólitos secundários, incluindo os antibióticos beta-lactâmicos, tais como ácido clavulânico, cefamicina C, penicilina N (produto intermediário na via de cefamicina C) (DORAN et al., 1990). Quanto às condições de cultivo, *Streptomyces clavuligerus* é capaz de crescer em uma ampla faixa de pH, de 5,0 a 8,5. O crescimento do microrganismo não ocorre em pH 4,0, nem em pH 9,0. A esporulação ocorre a partir de pH 5,0 a 6,5, sendo mais frequente a pH 6,0. Temperaturas de 26 a 30 °C favorecem o crescimento e a esporulação de *Streptomyces clavuligerus*; não se observa crescimento do microrganismo a temperaturas acima de 37 °C. A bactéria utiliza maltose como fonte de carbono, e é incapaz de assimilar frutose, xilose, glicose, celobiose, sacarose e celulose (HIGGENS E KASTNER, 1971).

Uma pesquisa para avaliar a influência da agitação na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em reator de escala de bancada concluiu que um dos efeitos do aumento da agitação foi a diminuição da atividade lipolítica no meio de cultivo, devido ao aumento das forças de cisalhamento, que pode ter fragmentado as células e alterado a conformação da enzima (LARGE et al., 1998). A atividade de lipase em meio de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* também já foi reportada como sendo induzida pela concentração de óleo e reprimida pela presença de glicerol no meio (ORTIZ et al., 2007). Em um estudo sobre produção de tacrolimus, um antibiótico com atividade imunossupressora, concluiu-se que o óleo de milho, principal fonte de carbono para a biossíntese do antibiótico, induziu a produção de lipase pela cepa mutante *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 (KIM E PARK, 2007).

As lipases de várias espécies de *Streptomyces* (*Streptomyces lividans*, *Streptomyces clavuligerus*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces erythreus*) foram investigadas quanto à sua localização e indução. Para todas as cepas estudadas, a atividade de lipase estava associada à célula (LARGE et al., 1999). As atividades hidrolíticas das lipases de *Streptomyces lividans*, *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces erythreus* foram detectadas mesmo na ausência de fonte lipídica no meio de produção. Já a atividade hidrolítica da lipase de *Streptomyces clavuligerus* foi detectada somente na presença de óleos no meio de produção, enquanto que, para a detecção de atividade hidrolítica da lipase

de *Streptomyces coelicolor*, foram necessárias altas concentrações de óleo no meio de produção da enzima, quando comparada às outras cepas (LARGE et al., 1999).

Estudos mais recentes relacionados à produção ou caracterização de lipases de *Streptomyces* estão sumarizados no Quadro 2.2.

Quadro 2.2: Trabalhos recentes sobre lipase produzidas por *Streptomyces*.

Microrganismo	Localização da lipase	Tipo de Fermentação	pH ótimo	Temp. ótima (°C)	Peso molecular (kDa)	Referência
<i>Streptomyces exfoliates</i> LP10	Extracelular	Submersa	-	-	60	Aly et al., 2012
<i>Streptomyces</i> sp. CS326	Extracelular	Submersa	7,0	40	17	Cho et al., 2012
<i>Streptomyces halstedii</i> ST 70	Extracelular	Submersa	-	-	-	Mishra e Gupta, 2014
<i>Streptomyces</i> sp. OC119-7	Extracelular	Submersa	8,0	50	-	Ayaz et al., 2015
<i>Streptomyces</i> sp. TEM 33	Extracelular	Submersa/ Estado sólido	-	-	-	Cadirci et al., 2016

(-) Informação não reportada.

Fonte: Elaborado pela autora.

Embora tenham sido anteriormente reportadas como enzimas aparentemente associadas à célula (LARGE et al., 1999), os poucos estudos atuais sobre lipases de *Streptomyces* têm como principal foco a purificação e caracterização da enzima extracelular (Quadro 2.2).

2.1.4 Aplicação de lipases na indústria

Devido à sua relevância natural, industrial e médica, as lipases atraem a atenção pela singularidade e versatilidade, sendo extensivamente estudadas.

Desde o papel usado para escrever, os queijos e óleos consumidos, os detergentes usados para remover manchas de óleo, o biodiesel aplicado como combustível de transporte, os medicamentos enantiopuros utilizados em tratamentos; todas essas aplicações são facilitadas direta ou indiretamente pelas lipases (NAGARAJAN, 2012).

Algumas aplicações das lipases nos diferentes setores industriais estão destacadas no Quadro 2.3.

Quadro 2.3: Aplicações das lipases nos diversos segmentos industriais.

Setor industrial	Ação das lipases	Aplicação do produto
Laticínios	Hidrólise do queijo, gordura, maturação de queijos, modificação da gordura da manteiga	Desenvolvimento de agente aromatizante no leite, queijo e manteiga
Panificadora	Melhoria do sabor	Prolongação do tempo de prateleira
Bebidas	Melhoria do aroma	Em bebidas alcoólicas, por exemplo, saquê
Alimentação saudável	Transesterificação	Óleos, lácteos, carnes modificados
Óleos e gorduras	Transesterificação e hidrólise	Manteiga de cacau, margarina (ácidos graxos, glicerol, mono- e diglicerídeos)
Lavanderia	Redução de manchas biodegradáveis	Lavagem de roupas
Cosméticos	Esterificação	Crems para pele e bronzadores, óleo de banho
Surfactantes	Substitui as fosfolipases na produção de lisofosfolipídeos	Poliglicerol e ésteres de ácidos graxos usados como detergentes industriais ou como emulsificantes em formulação alimentícias (molhos e sorvetes)
Agroquímicos	Esterificação	Herbicidas
Farmacêuticos	Hidrólise enantiosseletiva	Produz intermediários usados na fabricação de medicamentos
Combustíveis	Transesterificação	Produção de biodiesel
Controle de poluição	Hidrólise e transesterificação de óleos e graxas	Remoção de manchas pesadas e hidrólise de óleos e graxas
Papel e celulose	Hidrólise de triglicerídeos e ceras da polpa de celulose	Branqueamento do papel e redução de manchas de tinta

Fonte: Adaptado de Bora et al., 2013.

2.2 Biocatalisadores “whole-cell”

O conceito de biocatálise “whole-cell” é tipicamente utilizado quando uma reação de biotransformação exige múltiplas enzimas ou quando se torna difícil isolar a enzima das células (JOHANNES et al., 2006).

Os biocatalisadores “whole-cell” apresentam uma importante vantagem em relação às enzimas isoladas, na medida em que não é necessário reciclar cofatores (componentes não-proteicos envolvidos na catálise enzimática) (JOHANNES et al., 2006).

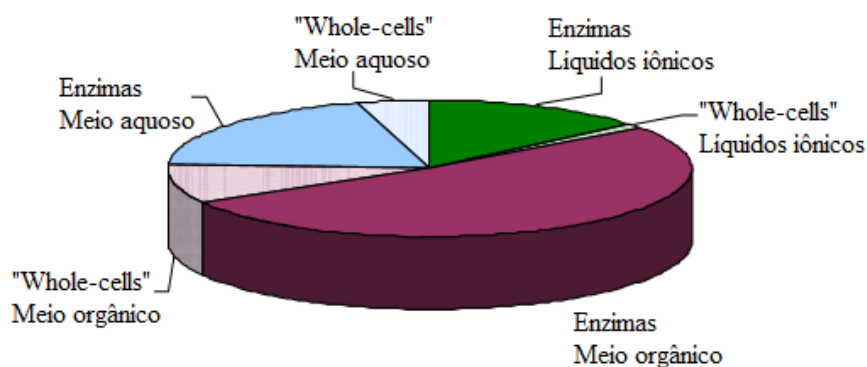
Mantidas em seu ambiente natural, as enzimas podem atuar em condições ótimas e contar com o auxílio dos cofatores e circuitos de regeneração. O ambiente celular também protege as enzimas de efeitos que possam desestabilizá-las ou degradá-las (SCHÜÜRMAN et al., 2014).

Entretanto, biocatalisadores “whole-cell” com enzimas intracelulares necessitam que o substrato e o produto sejam capazes de difundir através da membrana celular (SCHÜÜRMAN et al., 2014). A composição de ácidos graxos na membrana celular afeta sua permeabilidade (RUSSEL et al., 1995). A possibilidade de controlar a permeabilidade da membrana pela adição de diversos ácidos graxos ao meio de cultivo foi reportada para *Rhizopus oryzae* (HAMA et al., 2004). As células com membranas enriquecidas com ácidos oleico ou linoleico mostraram maior atividade inicial de metanólise do que células com membranas enriquecidas com ácidos graxos saturados. Os ácidos oleico e linoleico podem ter aumentado a permeabilidade da membrana, resultando no aumento da atividade de metanólise. Em contrapartida, os ácidos graxos saturados podem ter levado à rigidez da membrana, o que poderia significar estabilidade para a enzima (HAMA, et al., 2004). Por isso, uma razão entre ácido oleico e ácidos oleico e palmítico foi calculada. O valor de 0,67 resultou em alta atividade e estabilidade enzimática para o catalisador “whole-cell” de *R. oryzae* (HAMA et al., 2004).

Além da membrana que as envolve, as células contêm uma ampla variedade de outras enzimas que podem interferir na reação desejada. Esta é uma restrição severa, em particular, quando o catalisador “whole-cell” é utilizado para a produção de compostos farmacêuticos ou intermediários. Outra categoria de catalisadores “whole-cell”, com enzimas expostas na superfície das células, pode ser usada para superar esta restrição (SCHÜÜRMAN et al., 2014).

Dentre os estudos publicados sobre biocatálise na última década, a maioria refere-se a enzimas isoladas, como pode ser visto na Figura 2.2.

Figura 2.2: Distribuição de trabalhos publicados com enzimas isoladas e catalisadores “whole-cell” em diferentes meios reacionais.



Fonte: Adaptado de De Carvalho, 2011.

A Figura 2.2 indica ainda que os catalisadores “whole-cell” foram estudados, com maior frequência, nos meios orgânico e aquoso. Em sistemas orgânicos, o contato com o solvente influencia a fisiologia das células bacterianas (DE CARVALHO E DA FONSECA, 2004; HEIPIEPER et al., 2007). Dependendo da disponibilidade do substrato, as células podem metabolizar o solvente orgânico, o que resulta em uma influência significativa do solvente na atividade das células. Esse comportamento foi comprovado em células de *Rhodococcus erythropolis*, uma bactéria gram-positiva, que mostrou ser capaz de se adaptar a componentes tóxicos como o tolueno (DE CARVALHO et al., 2007).

A crescente compreensão sobre os mecanismos de adaptação e o desenvolvimento da microbiologia evolutiva e do ambiente podem ser usados para melhorar os microrganismos utilizados industrialmente (ZELDER E HAUER, 2000). As principais mudanças do ambiente podem ser efetuadas nos reatores (pressão osmótica, disponibilidade do substrato, oxigênio dissolvido, temperatura e pH) com o intuito de desenvolver estratégias de adaptação microbiana, podendo aumentar os rendimentos nas reações de catálise (DE CARVALHO, 2011). Ferramentas de monitoramento como corantes fluorescentes com microscopia de fluorescência e técnicas de citometria de fluxo, que permitem o estudo da viabilidade celular, pH interno e potencial da membrana celular, podem melhorar significativamente os resultados dos processos catalíticos (DE CARVALHO E DA FONSECA, 2007).

Um dos mais antigos exemplos de aplicação industrial de biocatalisadores “whole-cell” é a produção de ácido acético a partir do etanol usando células de *Acetobacter* imobilizadas, processo desenvolvido há mais de 200 anos (WANDREY et al., 2000).

Atualmente, com o auxílio de técnicas de engenharia genética e metabólica, os biocatalisadores “whole-cell” têm sido modificados para beneficiar os processos industriais, como o caso da produção de ácido láctico por células de *Lactobacillus* (PATNAIK et al., 2002). Um dos inconvenientes do processo de fermentação comercial era a forma predominante do produto, o lactato desprotonado ao invés de ácido láctico, exigindo etapas de purificação do produto. Isto ocorria porque a fermentação de *Lactobacillus* era conduzida a um pH mínimo de 5,0-5,5, acima do pKa do ácido láctico (3,87). Para superar esta limitação, um método de recombinação genômica para melhoria da cepa foi usado para aumentar a tolerância a ambientes ácidos de uma cepa industrial fracamente caracterizada de *Lactobacillus* (PATNAIK et al., 2002). Uma população de linhagens com melhoria sutil na tolerância a pH baixo foi isolada utilizando métodos clássicos de melhoria de cepas em

quimiostatos e foram, posteriormente, misturadas para criar linhagens mutantes capazes de crescer a pH substancialmente mais baixo do que a linhagem de tipo selvagem (PATNAIK et al., 2002).

Outro exemplo é a produção de 1,3 – propanodiol a partir de xarope de milho por *Escherichia coli* modificada geneticamente. Trata-se de um processo de alto rendimento da DuPont¹, em que se consome 40% menos energia e emite-se 20% menos gases de efeito estufa quando comparado ao processo usando petróleo (GAVRILESCU E CHISTI, 2005).

Empresas como Lonza² e Novozymes³ produzem soluções purificadas de proteínas recombinantes, hormônios e anticorpos usando células de microrganismos como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae* (DE CARVALHO, 2011).

2.2.1 Lipases “whole-cell”

As lipases associadas às células de fungos, leveduras ou bactérias podem ser utilizadas como biocatalisadores (lipases “whole-cell”) em diversas reações de biotransformação. As lipases “whole-cell” têm sido utilizadas com sucesso para produção de biodiesel (FUKUDA et al., 2008), síntese de compostos quirais (YU et al., 2007), síntese de ésteres (WANG et al., 2007) e processamento de óleos (HLAVSOVA et al., 2009).

Com o objetivo de utilizar a lipase “whole-cell” de *Rhizopus oryzae* para a produção de biodiesel, Wei et al. (2007) investigaram a performance do biocatalisador em meio não-aquoso contendo terc-butanol. Além de reportarem um rendimento em metil ésteres de 72%, os autores relataram o aumento da estabilidade do biocatalisador durante o uso repetido. A lipase “whole-cell” de *Rhizopus chinensis* também foi avaliada como biocatalisador para a produção de biodiesel (QIN et al., 2008). Os resultados mostraram que o uso da lipase “whole-cell” liofilizada resultou em um rendimento de 86% em metil ésteres e que o biocatalisador foi mais ativo em meio não-aquoso contendo heptano.

Linhagens de *Aspergillus* foram avaliadas como potenciais produtores de biocatalisadores “whole-cell” para produção de biodiesel. A simplicidade no processo de produção das lipases “whole-cell” de *Aspergillus* e o rendimento em metil ésteres acima de 90% foram reportados como pontos favoráveis para a utilização desses biocatalisadores na produção do biocombustível (INDUMATHI E RAJ, 2013; TALUKDER et al., 2013). Além

¹ Líder mundial em inovação e ciência, servindo mercados diversos como agricultura, nutrição, eletrônicos e comunicações, segurança e proteção, casa e construção, transporte e vestuário.

² Líder mundial no fornecimento de biofármacos para indústrias farmacêutica e de biotecnologia.

³ Líder mundial na produção de enzimas industriais.

de reações de transesterificação, as lipases de “whole-cell” de *Aspergillus* mostraram bom desempenho na resolução de misturas racêmicas. O biocatalisador, obtido de uma linhagem selvagem de *Aspergillus flavus*, foi usado para preparar (*R*)-1-acetato de feniletila, um composto orgânico aromático utilizado como agente flavorizante e odorificante em perfumaria. (*R*)-1-feniletanol foi esterificado em (*R*)-1-acetato de feniletila com 94,6% de excesso enantiomérico (*ee*) e (*S*)-1-feniletanol permaneceu no meio reacional com mais de 99%*ee* (SOLARTE et al., 2014).

A lipase “whole-cell” de *Burkholderia* sp. ZYB002 mostrou características atrativas para aplicação em processos químicos industriais. O biocatalisador foi estável a temperaturas acima de 70 °C por 1 hora, a uma ampla faixa de pH (3,0 a 8,5) por 6 horas e na presença de butanol por 24 horas (SHU et al., 2012). Já a lipase “whole-cell” de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 apresentou alta enantiosseletividade na hidrólise de DL-acetato de mentila em L-mentol, que foi obtido com 96% de pureza óptica. O biocatalisador ainda exibiu boa estabilidade operacional e tempo de meia-vida, a 30 °C, de 400 horas, aproximadamente (YU et al., 2007).

Utilizada na síntese de ésteres de aroma, a lipase “whole-cell” recombinante de *Escherichia coli* apresentou excelente tolerância a álcoois e ácidos graxos de cadeia curta. A síntese de acetato de isoamila (fragrância de banana), catalisada pela lipase “whole-cell” de *E. coli* alcançou uma conversão próxima de 100% após 24 horas em reator de leito fluidizado (BRAULT et al., 2014).

Na literatura é possível encontrar ainda estudos que relatam a imobilização de células contendo lipases em partículas de suporte de biomassa ou BSPs. Um exemplo da aplicação de lipase “whole-cell” imobilizada em BSPs é o uso de micélio de *Rhizopus oryzae* imobilizado dentro de espuma de poliuretano para a produção de biodiesel, a partir de óleo de soja e metanol (BAN et al., 2001).

2.3 Síntese de ésteres de ácidos graxos

Os ésteres são compostos comumente encontrados na natureza e estão geralmente associados ao odor de flores e frutas, podendo ser encontrados também na gordura animal ou em óleos vegetais (CALVALCANTE et al., 2015).

Estes compostos são usados em uma ampla variedade de produtos nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentícia. Atuam como agentes flavorizantes,

conferindo aroma aos alimentos. Suas aplicações técnicas e industriais ainda incluem o uso como lubrificantes, plastificantes e agentes anticorrosivos (KANASAWUD et al., 1992). O Quadro 2.4 mostra uma relação de ésteres de ácidos graxos e seus respectivos aromas.

A esterificação de Fischer, reação química entre um ácido carboxílico e um álcool na presença de um catalisador ácido e sob aquecimento, é um dos principais métodos empregados na indústria para a obtenção de ésteres.

Quadro 2.4: Ésteres de ácidos graxos usados como aromas de frutas na indústria alimentícia.

Nome	Estrutura	Aroma
Etanoato de etila		Maçã
Etanoato de <i>n</i> -octila		Laranja
Butanoato de etila		Abacaxi
Etanoato de 3-metil butila		Banana
Metanoato de etila		Groselha
Antranilato de metila		Uva
Acetato de propila		Pêra
Acetato de benzila		Pêssego
Butanoato de <i>n</i> -butila		Damasco
Etanoato de isobutila		Morango
Butanoato de <i>n</i> -pentila		Abriçó
Formato de isobutila		Framboesa

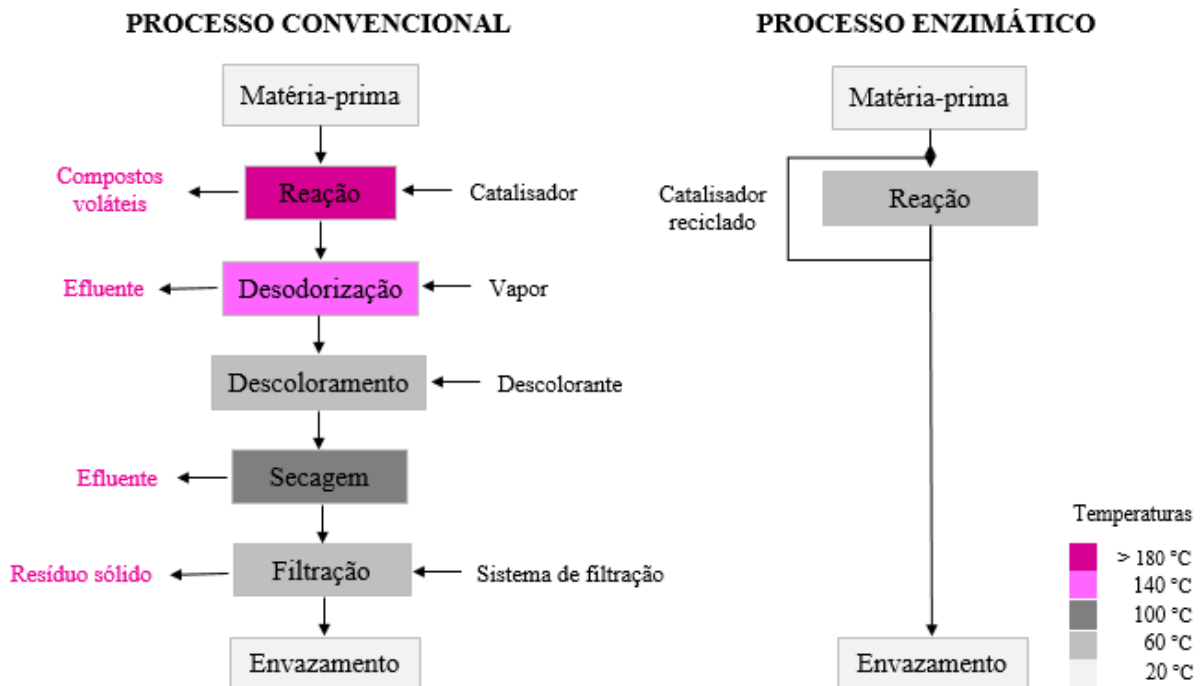
Fonte: Calvalcante et al., 2015.

Nos processos industriais, os ácidos minerais são utilizados como catalisadores, o que resulta na geração de uma grande quantidade de resíduos ácidos que necessitam de tratamento adequado antes do descarte (YADAV E RAHUMAN, 2002). A reação convencional consiste na catálise homogênea com ácido sulfúrico, que se dissolve no

meio reacional. Para sua remoção, lavagens aquosas alcalinas são realizadas ao final da reação. Apesar do ácido sulfúrico ser um catalisador de baixo custo e muito reativo, é também corrosivo e de difícil armazenamento (BONDIOLI, 2004).

Além dos catalisadores químicos, as lipases podem ser usadas como catalisadores na reação de esterificação/transesterificação para a produção de ésteres. Nos últimos anos, pesquisadores tem estudado a catálise enzimática para produção de ésteres empregados na indústria de cosméticos (GANI et al., 2011; RAHMAN et al., 2011). As vantagens da utilização da catálise enzimática estão na especificidade do biocatalisador, resultando em produtos com maior grau de pureza, e das temperaturas mais brandas de reação (30-60 °C, enquanto que via catálise química, a reação ocorre na faixa de 100-250 °C), o que reduz o custo energético do processo. A Figura 2.3 apresenta um fluxograma simplificado que compara os processos convencional e enzimático para a produção de ésteres.

Figura 2.3: Etapas dos processos com catálise química e com catálise enzimática para a produção de ésteres empregados na indústria de cosméticos.



Fonte: Adaptado de Ansorge-Schumacher e Thum, 2013.

A utilização do processo enzimático nas indústrias, porém, esbarra no alto custo das enzimas quando comparado ao dos catalisadores químicos e no tempo de reação que, em alguns casos, é mais longo do que no processo convencional (FERREIRA, 2016). O desenvolvimento de processos menos onerosos de produção de enzimas e que possibilitem a

reutilização do biocatalisador seriam estratégias para viabilizar a aplicação do processo enzimático nas indústrias (FERREIRA, 2016). Atualmente, a Evonik Industries⁴ é uma das poucas empresas que produzem ésteres empregados na formulação de cosméticos por processo enzimático a partir de recursos renováveis (FERREIRA, 2016).

Na indústria alimentícia, a formação de ésteres de ácidos graxos com propriedades flavorizantes via processo convencional com catalisadores químicos resulta na produção de “aromas artificiais”, o que confronta com a recente demanda pública por produtos naturais (SALLEH et al., 2016). A rota enzimática seria uma alternativa para a obtenção de “aromas naturais”, uma vez que as lipases são catalisadores biológicos.

Os ésteres de ácidos graxos apresentam benefícios em aplicações de cunho sustentável. O uso de ésteres de metila ou etila como substitutos do combustível diesel é um dos exemplos mais conhecidos da aplicação “verde” dos ésteres. O biodiesel, como também são conhecidos os ésteres de metila e etila, é biodegradável, não tóxico e obtido por meio da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal (VAN GERPEN et al., 2004; LIMA et al., 2015).

2.3.1 Butirato de butila

Os ésteres de butirato pertencem ao grupo de ésteres de cadeia curta que possuem propriedades aromatizantes. Naturalmente presentes no abacaxi, manga, damasco e banana, os ésteres de butirato são utilizados como aditivos na indústria alimentícia (RAJENDRAN et al., 2009). O butirato de butila é o éster predominantemente presente no aroma de abacaxi (LORENZONI et al., 2012) e damasco (CALVALCANTE et al., 2015). A alta demanda por butirato de butila nas indústrias alimentícia, de bebidas e farmacêutica se deve ao aroma frutado doce que o éster confere aos produtos (SANTOS E De CASTRO, 2006).

A síntese de butirato de butila por rota enzimática tem sido reportada com sucesso, com rendimento em éster acima de 90%. Catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em casca de ovo, a reação envolvendo ácido butírico e butanol com condições otimizadas de temperatura, concentração de substrato e carga de enzima resultou em 93% de conversão em butirato de butila (SALLEH et al., 2016). Outros trabalhos também relataram a síntese de butirato de butila tendo como catalisador a lipase de *Thermomyces*

⁴ Multinacional alemã, fabricante de especialidades químicas para os setores automotivo, de plásticos, produtos farmacêuticos e outras indústrias.

lanuginosus imobilizada (MATTE et al., 2016; MARTINS et al., 2013; MENDES et al., 2013). Lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em suporte epóxi-quitosana/alginate foi avaliada como catalisador na síntese de butirato de butila, sendo 62% a máxima conversão em éster alcançada após 24 h de reação (MENDES et al., 2013). Resultado similar foi obtido pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em micropartículas magnéticas; aproximadamente 60% de conversão em butirato de butila após 24 h de reação (KOPP et al., 2015).

Em geral, os estudos relatam a produção de butirato de butila a partir da reação de esterificação entre ácido butírico e butanol catalisada por lipases, em meio orgânico e na presença de um agente dessecante, adicionado ao meio reacional com o objetivo de remover a água produzida no processo.

Por meio de processo biológico de múltiplas etapas, pesquisadores reportaram outra abordagem para a síntese de butirato de butila utilizando ácido butírico e butanol provenientes de processos fermentativos. No método biológico de síntese do éster de aroma, butanol e ácido butírico foram produzidos separadamente por fermentações em batelada e batelada alimentada, respectivamente, utilizando um hidrolisado de farinha de trigo como substrato e linhagens selecionadas de *Clostridium*. O álcool foi recuperado do caldo fermentado por destilação e o ácido butírico por extração com solvente. A reação de esterificação para obtenção do butirato de butila foi catalisada pela lipase de *Mucor miehei* em heptano. A produção de butirato de butila por esse processo natural de múltiplas etapas resultou em um rendimento de 0,18 kg de butirato de butila por kg de farinha de trigo, com pureza de 99,9% (FAYOLLE et al., 1991).

2.4 Considerações finais

A revisão bibliográfica mostrou que a utilização de processos enzimáticos na indústria, exemplificada pela produção de ésteres de ácidos graxos, apresenta uma série de vantagens em relação aos processos convencionais com catalisadores químicos. No entanto, o alto custo das enzimas é um dos principais responsáveis por inviabilizar o uso desses biocatalisadores em processos industriais.

As lipases são enzimas de grande importância industrial e, devido a sua versatilidade, seguem sendo extensivamente estudadas. No caso das lipases de *Streptomyces*, cabe salientar que há poucos estudos sobre sua produção e seu potencial catalítico, e até o momento, não há relatos de estudos que explorem a utilização da lipase associada à célula

(“whole-cell”) como biocatalisador. A produção da lipase “whole-cell” se mostra como uma estratégia atrativa para a obtenção direta do biocatalisador, evitando-se agregar a este os custos de purificação e imobilização da enzima isolada.

Nesse sentido, este trabalho apresenta os estudos realizados para o desenvolvimento do processo de produção da lipase “whole-cell” de *Streptomyces clavuligerus* e a avaliação do potencial catalítico e de aplicação desse biocatalisador na síntese de um composto com valor agregado.

Capítulo 3 – Estabelecimento de um protocolo para a produção de lipase por *Streptomyces clavuligerus* em fermentação submersa - Estudos preliminares

3.1 Introdução

Os primeiros cultivos foram realizados com o intuito de avaliar o microrganismo *Streptomyces clavuligerus* como produtor de lipase e estabelecer um protocolo para a produção da enzima.

Este capítulo apresenta a avaliação de duas linhagens de *S. clavuligerus*, uma selvagem e outra mutante, para a produção de lipase. Selecionada a linhagem do microrganismo, um estoque de criotubos foi preparado para ser utilizado ao longo da pesquisa. A metodologia empregada para a preparação dos criotubos está descrita neste capítulo.

A atividade hidrolítica de lipase de *S. clavuligerus* foi medida em amostras de sobrenadante após centrifugação do caldo fermentado e no sobrenadante após rompimento dos pellets por sonicação a fim de se avaliar as atividades lipolíticas extra e intracelular, respectivamente. Um estudo foi conduzido com o objetivo de determinar o tempo de rompimento celular por sonicação.

No que diz respeito aos procedimentos de cultivo, o ponto de partida foi a utilização do protocolo utilizado no cultivo de *S. clavuligerus* para produção de ácido clavulânico. Essa escolha foi baseada nos resultados previamente reportados de atividade hidrolítica de lipase em meio de produção do antibiótico. Para os ensaios preliminares, a principal modificação em relação à metodologia para produção de ácido clavulânico foi o pH. Nos cultivos para a produção do antibiótico, o pH dos meios de reativação, inóculo e produção era 6,8. Para a produção de lipase, o pH 7,4 foi utilizado desde a etapa de reativação, considerando que esse pH foi relatado como sendo o de maior atividade hidrolítica de lipase produzida por *S. clavuligerus* (LARGE et al., 1999) e está dentro da ampla faixa de pH na qual o microrganismo é capaz de crescer (HIGGINS E KASTNER, 1971). O perfil de crescimento do microrganismo no inóculo com e sem indutor de lipase (óleo de soja), bem como a importância da etapa de inóculo na produção da enzima foram investigados e os resultados também são apresentados neste capítulo.

3.2 Materiais

3.2.1 Reagentes

Para a realização dos experimentos, foram utilizados os seguintes reagentes:

- i. Peptona bacteriológica e extrato de malte da Acumedia®,
- ii. Extrato de levedura e peptona de soja da Himedia®,
- iii. Tampão MOPS e acetona da Qhemis®,
- iv. Glicerol e goma arábica da Synth®,
- v. Triton X-100 da Vetec®,
- vi. Álcool isopropílico da Cinética®,
- vii. p-nitrofenil palmitato (p-NPP) e tributirina da Sigma-Aldrich®,
- viii. Óleo de soja da marca Liza® e azeite de oliva da marca Carbonell®.

Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico e foram obtidos da Qhemis®.

3.2.2 Microrganismos

Os microrganismos *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 (linhagem selvagem) e *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826 (um mutante natural) foram adquiridos pelo Prof. Aberto Colli Badino Junior (DEQ/UFSCar) e gentilmente doados para este trabalho sob a forma de células vegetativas (aprox. 5,0 g.L⁻¹ em massa seca) preservadas em criotubos e armazenadas a -70°C em solução crioprotetora de glicerol 20% (v/v).

3.3 Métodos

3.3.1 Preparação do estoque de trabalho

Após a escolha da linhagem de *S. clavuligerus*, um estoque de criotubos, contendo a suspensão de células vegetativas do microrganismo, foi preparado para ser utilizado durante toda a pesquisa. Para a preparação do estoque, foram realizados os seguintes passos:

Passo 01 - O conteúdo de um criotubo, uma suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus* preparada conforme descrito por Teodoro (2008), foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL do meio de reativação de Ortiz et al. (2007). O frasco foi incubado em câmara rotativa a 30 °C e 250 rpm por 24 h.

O meio de reativação, Ortiz et al. (2007), mantido a pH 6,8, apresentava a seguinte composição (g.L⁻¹ em água destilada): glicerol, 15,0; peptona bacteriológica, 10,0; extrato de malte, 10,0; extrato de levedura, 1,0; K₂HPO₄, 2,5; MgSO₄.7H₂O, 0,75; MnCl₂.4H₂O, 0,001; FeSO₄.7H₂O, 0,001; ZnSO₄.7H₂O, 0,001; tampão MOPS, 21,0.

Passo 02 - Após 24 h, alíquotas de 5 mL de suspensão serviram de inóculo para 4 frascos Erlenmeyer de 500 mL, cada um contendo 45 mL do mesmo meio de reativação, descrito anteriormente. Os frascos foram incubados em câmara rotativa a 30 °C e 250 rpm por mais 24 h.

Passo 03 - Após o período de incubação, os conteúdos dos 4 frascos foram misturados e a suspensão resultante foi diluída em glicerol para uma concentração final de 20% ($V_{\text{glicerol}}/V_{\text{suspensão final}}$). Esta suspensão de células em glicerol foi transferida para criotubos (3,5 mL) e armazenadas em ultrafreezer a -70 °C. O lote com cerca de 50 criotubos foi denominado de “estoque de trabalho”.

3.3.2 Meios de cultura

Meio de reativação

Nos experimentos voltados a produção de lipase, o meio de reativação utilizado foi baseado nos trabalhos de Ortiz et al. (2007), com modificações na concentração de glicerol e no pH, conforme descrito no Quadro 3.1. O pH foi ajustado para 7,4 e o meio de cultura esterilizado a 121 °C por 10 min, em autoclave.

Quadro 3.1: Meio de reativação de Ortiz et al. (2007) com modificações.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Glicerol	60,0
Peptona bacteriológica	10,0
Extrato de malte	10,0
Extrato de levedura	1,0
Tampão MOPS	21,0
K ₂ HPO ₄	2,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,75
Solução de sais*	1,0 (mL/L)

* Solução de sais (g.L⁻¹ de água destilada): MnCl₂.4H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 1,0; ZnSO₄.7H₂O, 1,0.

Meios de crescimento (inóculo) e produção

Para o crescimento do microrganismo (inóculo) e produção de lipase, foram utilizados meios de cultura similares, conforme descrito por Maranesi et al. (2005), porém, com modificações na fonte de carbono, nitrogênio e pH (Quadro 3.2). O pH foi corrigido para 7,4 e os meios de cultura esterilizados a 121 °C por 10 min, em autoclave.

Quadro 3.2: Composição do meio de cultura modificado para o crescimento do microrganismo e produção de lipase.

Componentes	Concentração (g.L⁻¹)
Glicerol	10,0
Peptona de soja	20,0
Óleo de soja	23,0
Tampão MOPS	21,0
K ₂ HPO ₄	1,2
Solução de sais*	1,0 (mL/L)

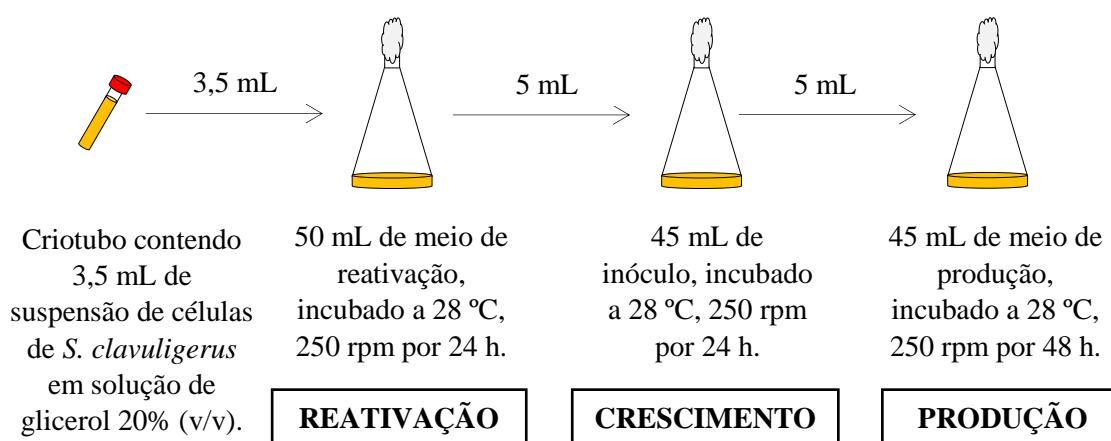
* Solução de sais (g.L⁻¹ de água destilada): MnCl₂.4H₂O, 1,0; FeSO₄.7H₂O, 1,0; ZnSO₄.7H₂O, 1,0.

Na metodologia descrita por Maranesi et al. (2005), o inóculo e o meio de produção continham, originalmente, amido solúvel (10 g.L⁻¹) como fonte de carbono, farinha de soja (20 g.L⁻¹) como fonte de nitrogênio e pH 7,0.

3.3.3 Metodologia experimental para o cultivo de *S. clavuligerus*

Os cultivos de *S. clavuligerus* para produção de lipase consistiram em três etapas. Primeiramente, o conteúdo de um criotubo (3,5 mL de uma suspensão de células vegetativas de *S. clavuligerus*) foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de reativação. O meio de reativação foi mantido em câmara incubadora rotativa (New Brunswick Scientific Innova®44) a 28 °C e 250 rpm por 24 h. Posteriormente, uma alíquota da cultura reativada (10% v/v) foi transferida para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de inóculo, também mantidos em câmara incubadora a 28 °C e 250 rpm por 24 h. Finalmente, frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de meio de produção foram inoculados com 5 mL de meio de crescimento (10% v/v do inóculo) e incubados nas mesmas condições de cultivo do inóculo por 48 h (Figura 3.1).

Figura 3.1: Procedimento experimental para cultivo em câmara incubadora rotativa



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3.4 Recuperação da lipase intracelular

Um ensaio preliminar de produção de lipase por *S. clavuligerus* ATCC 27064 mostrou atividade desta enzima no meio de cultivo (lipase extracelular) e após o rompimento das células (lipase intracelular). Assim, um experimento foi realizado para a determinação do tempo de rompimento necessário para que a lipase intracelular fosse completamente liberada. Para tanto, amostras de 20 mL contendo massa celular, proveniente do caldo fermentado, e tampão fosfato 25 mM pH 7,0 (densidade óptica ~2,0) foram preparadas, imersas em gelo e submetidas a ondas sonoras em sonicador da marca Sonics vibracell™, 20 kHz, adotando sequencialmente pulsos e pausas de 30 segundos por 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min. Após o rompimento, as amostras foram centrifugadas a $12.857 \times g$ a 4 °C por 15 min. Posteriormente, determinou-se a atividade lipolítica do sobrenadante pelo método de hidrólise do azeite de oliva, descrito por Soares et al. (1999), com modificações. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.5 Escolha da linhagem de *S. clavuligerus*

As linhagens selvagem (*S. clavuligerus* ATCC 27064) e mutante (*S. clavuligerus* DSM 41826) foram avaliadas quanto à produção de lipases extra e intracelulares. Para tanto, os microrganismos foram cultivados conforme metodologia descrita no item 3.3.3. Os frascos contendo meio de produção foram removidos da câmara incubadora rotativa a cada 12 h para análise de atividade hidrolítica (item 3.3.8) de amostras dos sobrenadantes obtidos após centrifugação do caldo fermentado e após rompimento dos pellets por sonicação. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.6 Curva de crescimento de *S. clavuligerus*

Para a determinação do perfil de crescimento de *S. clavuligerus*, foram realizadas as duas primeiras etapas do cultivo do microrganismo em câmara incubadora rotativa (item 3.3.3). Os meios de reativação e de crescimento (inóculos) foram preparados conforme descrito no item 3.3.2, sendo que em um dos inóculos não foi adicionado óleo de soja. Os inóculos, na presença e ausência de indutor (óleo de soja), foram mantidos em câmara rotativa a 250 rpm e 28 °C por 72 h. A curva de crescimento foi determinada por medida de absorvância em espectrofotômetro da marca Pharmacia Biotech modelo Ultrospec 2100 a 600 nm (referência – água destilada) de amostras retiradas periodicamente dos dois inóculos. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.7 Influência da etapa de inóculo para a produção de lipase por *S. clavuligerus*

Com o objetivo de estudar a influência da etapa de crescimento (inóculo) na produção de lipase por *S. clavuligerus*, um cultivo foi conduzido nas mesmas condições operacionais (item 3.3.3) e com meios de reativação e produção com composição idêntica à do cultivo convencional (item 3.3.2), porém sem a etapa de inóculo. As atividades hidrolíticas das amostras contendo lipase extra e intracelulares foram medidas conforme metodologia descrita no item 3.3.8. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados de atividade hidrolítica foram comparados aos obtidos nos ensaios de produção de lipase por *S. clavuligerus*, com a etapa de crescimento.

3.3.8 Atividade hidrolítica de lipase

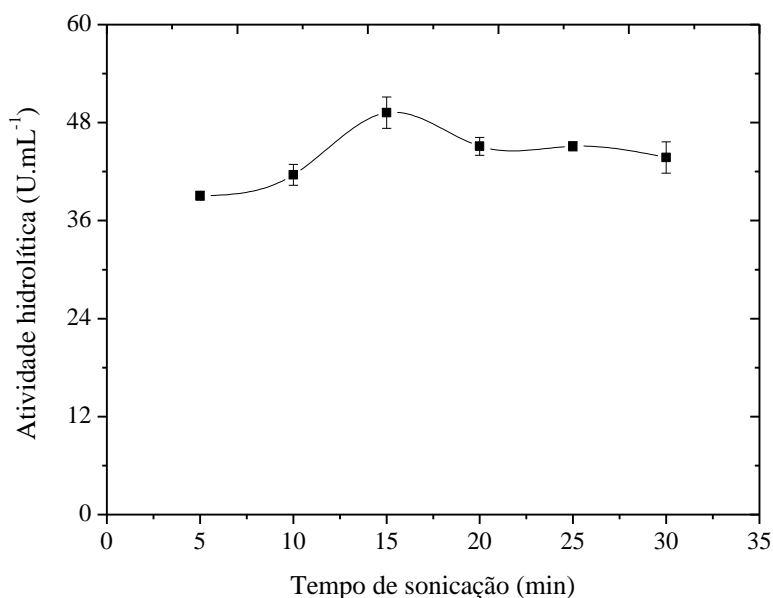
Nos ensaios de produção, as atividades hidrolíticas das lipases extra e intracelulares foram medidas a 37 °C, pH 7,0, usando p-NPP como substrato (Kordel et al., 1991). Uma emulsão de 0,8 mM de p-NPP foi preparada, adicionando 1,0 mL da solução de p-NPP (3,0 g.L⁻¹ em isopropanol) a 9,0 mL de tampão fosfato de sódio, 100 mM, pH 7,0, contendo Triton X-100 (0,45 g.L⁻¹) e goma arábica (1,11 g.L⁻¹). Em um reator de vidro, 0,9 mL da solução enzimática foi adicionado a 8,1 mL de emulsão. A mistura reacional foi mantida sob agitação por 10 min e amostras foram retiradas a cada 2,5 min. A absorvância das amostras foi medida a 410 nm em espectrofotômetro, usando 2,7 mL de emulsão com 0,3 mL de água destilada como referência. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1,0 µmol por min de p-nitrofenol nas condições experimentais especificadas.

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Recuperação da lipase intracelular

O experimento de rompimento celular indicou que a maior liberação de lipase intracelular ocorreu em 15 min. O aumento no tempo de sonicação pode ter causado algum dano à estrutura da lipase, o que explicaria a diminuição na atividade hidrolítica a partir de 20 min de rompimento (Figura 3.2).

Figura 3.2: Atividade hidrolítica em função do tempo de sonicação das células de *S. clavuligerus* em tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 (suspensão celular DO ~ 2,0 mantida em banho de gelo).



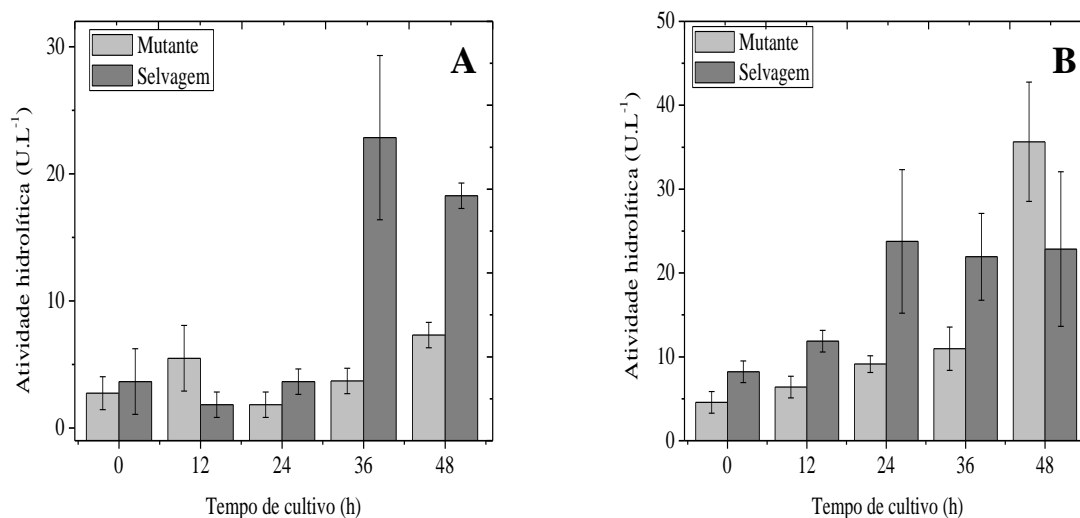
A inativação enzimática pode ocorrer devido a efeitos mecânicos ou químicos causados pela exposição prolongada a ondas sonoras, mesmo a baixas temperaturas, que podem alterar as características das enzimas. As ondas sonoras promovem a cavitação, isto é, a formação de pequenas bolhas que colapsam violentamente devido à variação de pressão, originando as tensões mecânicas responsáveis pela ruptura celular e que podem afetar a conformação da enzima (THAKUR E NELSON, 1997). A sonicação também promove a formação de radicais livres H^+ e OH^- , provenientes da decomposição da água (ELPINER et al., 1965). Alguns resíduos de aminoácidos, responsáveis pela estabilidade ou catálise enzimática, podem reagir com esses radicais livres, afetando a atividade das enzimas (LOPEZ

E BURGOS, 1995). Portanto, determinou-se o tempo de rompimento das células de *S. clavuligerus* de 15 min para os ensaios posteriores.

3.4.2 Escolha da linhagem de *S. clavuligerus*

Sob as mesmas condições de cultivo, a linhagem selvagem apresentou melhor resultado de atividade de lipase intracelular. A atividade hidrolítica ($18,3 \text{ U.L}^{-1}$) em meio de cultivo da linhagem selvagem foi 2,5 vezes maior do que a atividade hidrolítica ($7,3 \text{ U.L}^{-1}$) de lipase intracelular em meio de cultivo da linhagem mutante em 48 h de cultivo (Figura 3.3A).

Figura 3.3: Atividade hidrolítica de lipase intracelular (A) e extracelular (B) em função do tempo de cultivo de *S. clavuligerus* a 28°C , pH 7,4 e 250 rpm.



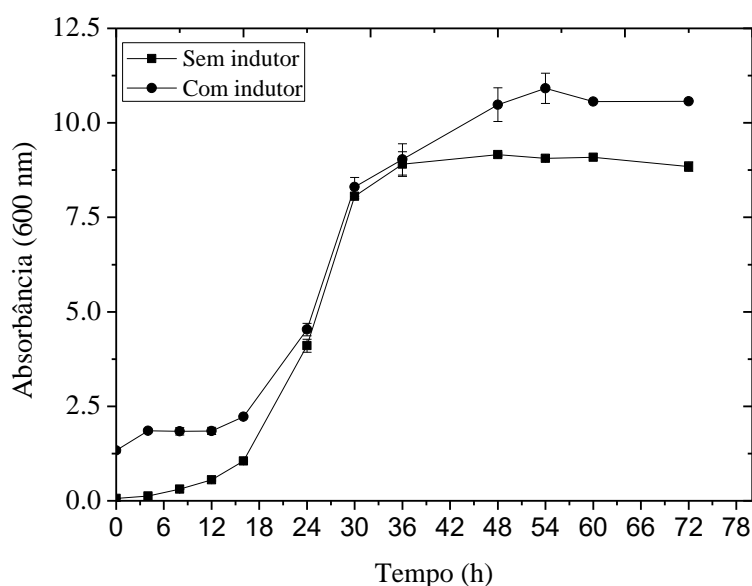
A produção de lipase extracelular pela linhagem mutante foi superior à da linhagem selvagem no período total de cultivo (48 h), conforme mostra a Figura 3.3B. Entretanto, a máxima atividade volumétrica produzida pela cepa selvagem foi obtida com 24 h de cultivo ($23,8 \pm 8,6 \text{ U.L}^{-1}$), representando uma produtividade volumétrica de $0,99 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Já a atividade volumétrica máxima produzida pela cepa mutante foi obtida com 48 h de cultivo ($35,6 \pm 7,1 \text{ U.L}^{-1}$), representando uma produtividade volumétrica de $0,74 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Considerando o potencial de produção de lipase “whole-cell”, foi escolhida a linhagem selvagem para a continuidade dos estudos de produção de lipase, uma vez que a produção de lipase intracelular foi maior em meio de cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064.

3.4.3 Curva de crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064

A Figura 3.4 mostra a curva do perfil de crescimento do microrganismo no inóculo na presença e na ausência do óleo de soja. Observou-se que a duração da fase lag ou de adaptação do microrganismo, na qual os valores de absorvância pouco variaram, foi de aproximadamente 16 h nos dois inóculos. Do início da fase exponencial em 16 h até 36 h de incubação, as curvas dos inóculos com e sem indutor mostraram comportamento semelhante.

Figura 3.4: Perfil de crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064 a 28 °C, pH 7,4, 250 rpm na presença (●) e ausência (■) de óleo de soja.



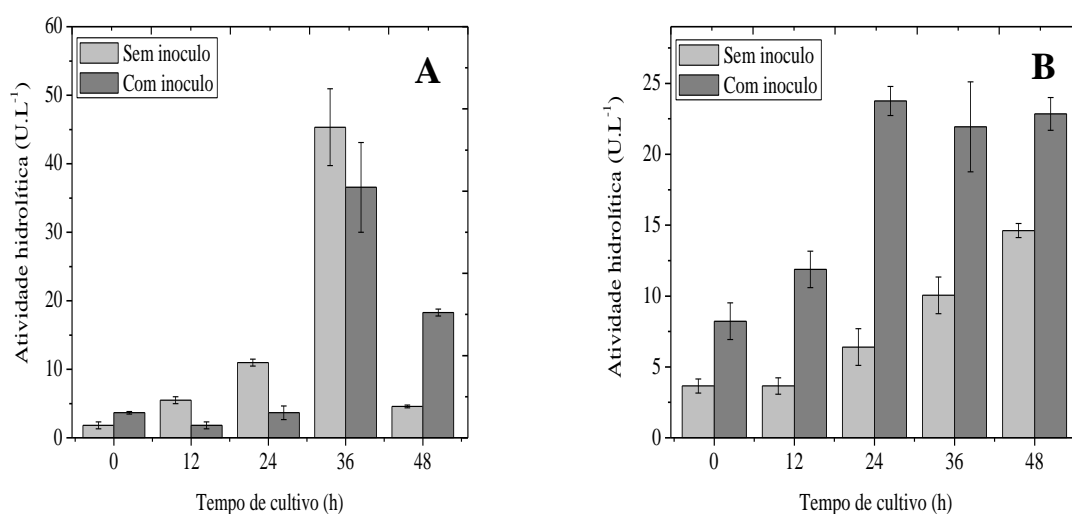
Após esse período, a curva de crescimento de *S. clavuligerus* no inóculo sem indutor mostrou que o microrganismo havia entrado na fase estacionária (36 h), na qual se manteve até 72 h de incubação. Já no inóculo com indutor, a curva de crescimento do microrganismo mostrou uma segunda fase na qual os valores de absorvância aumentaram, de 36 a 48 h, porém de maneira menos acentuada do que na fase exponencial. Esse comportamento pode ser definido como crescimento díauxico, no qual o segundo substrato começa a ser consumido pelo microrganismo. O primeiro substrato consumido foi o glicerol, presente nos dois inóculos e o segundo, o óleo de soja, fonte de carbono e indutor de lipase, presente em apenas um dos inóculos. Somente com 48 h de incubação, o microrganismo cultivado em inóculo com indutor entrou na fase estacionária.

Como descrito no item 3.3.3, a duração da etapa de crescimento em ensaios de produção de lipase foi de 24 h. Pelo perfil de crescimento, verificou-se que, em 24 h, o microrganismo se encontrava na fase exponencial, período de maior atividade metabólica da célula e favorável para o inóculo do meio de produção.

3.4.4 Influência da etapa de inóculo para a produção de lipase por *S. clavuligerus*

A atividade de lipase intracelular foi maior no processo sem a etapa de inóculo até 24 h de cultivo, como mostra a Figura 3.5A. Com 36 h de cultivo, porém, não houve diferença significativa na atividade entre os processos de produção de lipase intracelular com e sem etapa de inóculo. A máxima atividade intracelular no cultivo sem inóculo foi de $45,3 \pm 5,6$ U.L⁻¹ em 36 h (produtividade volumétrica igual a $1,3$ UL⁻¹h⁻¹). Já a atividade após o rompimento das células no cultivo com inóculo, no mesmo período, foi de $36,6 \pm 6,6$ U.L⁻¹ (produtividade volumétrica de $1,0$ UL⁻¹h⁻¹). Com 48 h de cultivo, observou-se que a atividade hidrolítica de lipase intracelular diminuiu consideravelmente, sendo que, no processo de produção sem a etapa de inóculo, a diminuição da atividade enzimática foi mais acentuada (Figura 3.5A).

Figura 3.5: Atividade hidrolítica de lipase intracelular (A) e extracelular (B) em função do tempo de cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064 a 28°C, pH 7,4, 250 rpm com a etapa de inóculo contendo óleo de soja e sem a etapa de inóculo.



Com relação à produção de lipase extracelular, a influência favorável da etapa de inóculo ficou mais evidente. No cultivo com inóculo, a atividade hidrolítica chegou a 22,9

$\pm 1,2 \text{ U.L}^{-1}$ em 48 h, cerca de 1,5 vezes maior do que a atividade no cultivo sem inóculo, no mesmo período (Figura 3.5B).

No entanto, os resultados sugerem um aumento na atividade hidrolítica da lipase extracelular após 48 h, principalmente para o cultivo sem etapa de inóculo, o que poderia ser confirmado em ensaios com maior tempo de fermentação. Ainda assim, pode-se concluir que a produção de lipase extracelular em cultivo sem a etapa de inóculo foi mais lenta ao longo do período monitorado.

Na literatura, a preparação do inóculo é relatada como uma etapa importante nos processos fermentativos para a produção de uma variedade de compostos, como enzimas, fármacos, vitaminas, aminoácidos, proteínas recombinantes, produtos alimentícios e bebidas (SOOD et al., 2011). O principal objetivo nessa fase é a obtenção de biomassa viável em condições fisiológicas apropriadas para sua utilização como inóculo no meio de produção. Um inóculo apropriado deve estar livre de contaminação, conter células em fase de crescimento ativo e que tenham capacidade de formar o produto desejado (SOOD et al., 2011).

Dos resultados apresentados, concluiu-se que a preparação do inóculo, cuja composição de nutrientes era idêntica à do meio de produção, favoreceu a produção de lipase extracelular. Ainda que a ausência dessa etapa não tenha comprometido a produção de lipase intracelular, optou-se por manter a preparação de inóculo como etapa do processo de produção de lipase por *S. clavuligerus*.

3.5 Conclusões

Em relação à escolha da linhagem de *S. clavuligerus*, concluiu-se que a cepa selvagem (ATCC 27064) apresentou melhores resultados de atividade hidrolítica de lipase intracelular ($18,3 \text{ U.L}^{-1}$ contra $7,3 \text{ U.L}^{-1}$ da cepa mutante) e de produtividade volumétrica de lipase extracelular ($0,99 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$ contra $0,74 \text{ UL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para cepa mutante). Portanto *S. clavuligerus* ATCC 27064 apresentou grande potencial de produção de lipase extracelular e intracelular. A atividade intracelular mais alta da linhagem selvagem motivou o uso das células de *S. clavuligerus* como biocatalisador (lipase “whole-cell”) em reações de biotransformação.

A curva de crescimento de *S. clavuligerus* ATCC 27064 mostrou que a duração da etapa de inóculo, 24 h, coincidiu com a fase exponencial de crescimento do

microrganismo. Pode-se concluir também que a etapa de inóculo teve influência positiva na produção de lipase, principalmente a extracelular. Estes resultados confirmaram que a etapa de crescimento com duração de 24 h, previamente definidas para a produção de ácido clavulânico, também favoreceu a produção de lipases.

Assim, novos estudos foram direcionados para a melhoria da composição do meio de cultivo de *S. clavuligerus* ATCC 27064 e das condições operacionais para produção de lipase, visando o aumento da produtividade volumétrica. O desenvolvimento destes estudos está apresentado no Capítulo 4.

Capítulo 4 – Melhoria das condições de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* para a produção de lipase e estudo das propriedades bioquímicas da lipase “whole-cell”

Este capítulo, organizado na forma de artigo científico, apresenta a continuidade dos estudos para o estabelecimento das condições de cultivo para a produção de lipase por *S. clavuligerus* em fermentação submersa.

Os baixos valores de atividade hidrolítica de lipase extracelular e intracelular após recuperação da enzima por rompimento celular motivaram um estudo para a confirmação da localização da lipase de *S. clavuligerus*. Nesta etapa, amostras do caldo completo e do pellet intacto obtido após centrifugação do caldo também foram avaliadas quanto à atividade hidrolítica. O resultado deste estudo foi bastante relevante, motivando a avaliação da lipase associada à célula, ou lipase “whole-cell”, como biocatalisador. Vale ressaltar que essa abordagem é inédita na literatura quanto à lipase intracelular de *S. clavuligerus*, pois pesquisas mais recentes sobre essa lipase tratam da purificação e caracterização da enzima extracelular.

Com relação às condições de cultivo de *S. clavuligerus* em câmara incubadora rotativa para produção de lipase, foram avaliados tipos de frascos Erlenmeyer (comuns e com aletas), fonte de carbono, influência do glicerol, pH do meio de produção e temperatura de incubação. Além disso, ensaios em reator de bancada foram conduzidos com o intuito de avaliar os efeitos da agitação e da aeração na produtividade da lipase.

As propriedades bioquímicas da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* (*Sc-WCL*), tais como, pH e temperatura de maior atividade hidrolítica, e estabilidade térmica, também são apresentadas neste capítulo. O potencial catalítico da *Sc-WCL* foi investigado em reações de hidrólise e esterificação e comparado com enzimas comerciais.

Evaluation of *Streptomyces clavuligerus* as lipase producer and whole-cell lipase as biocatalyst

ABSTRACT: This work evaluated a wild-type *Streptomyces clavuligerus* strain as a lipase producer by submerged fermentation using both an orbital shaker and a bench-scale bioreactor. The location of the *S. clavuligerus* lipase was investigated by analysing the hydrolytic activity in whole broth, supernatant, and resuspended pellet samples. The effects of type of flask, carbon source, pH, and temperature on lipase activity were evaluated by measuring the hydrolytic activity of whole broth samples. In the case of the bioreactor, the effects of agitation and aeration on lipase productivity were assessed. The catalytic potential of the *S. clavuligerus* whole-cell lipase (*Sc*-WCL) was evaluated using hydrolysis and esterification reactions. Investigation was also made of the biochemical properties of *Sc*-WCL, such as pH and temperature optima and stability. The results showed that hydrolytic activity was detected in all the samples, but especially in samples containing cells, which led to the production of whole-cell lipase. Using the orbital shaker, lipase hydrolytic activity of $3.0 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ was achieved after 36 h fermentation using glycerol-free production medium in a baffled Erlenmeyer flask at 28 °C and pH 6.8. Maximum productivity of $52.5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ was achieved after 24 h in bioreactor fermentation using glycerol-free production medium at pH 6.8 and 28 °C, with agitation at 400 rpm and aeration at 1 vvm. It was concluded that only stirrer speed had a significant effect on lipase productivity. *Sc*-WCL was shown to be more active at 60 °C and pH 10.7, while greater stability was obtained at 30-40 °C after 1 h incubation at pH 10. The catalytic activity of *Sc*-WCL in hydrolysis reactions was comparable to that of commercial lipases. Furthermore, the biocatalyst presented potential for application in esterification reactions.

Keywords: Whole-cell lipase; *Streptomyces clavuligerus*; Submerged cultivation; Hydrolytic activity; Esterification activity.

4.1 Introduction

Lipases are highly selective enzymes (enantiomeric and regioselective) that catalyse the hydrolysis of a wide range of esters, especially those that are insoluble in water, such as triglycerides. Furthermore, they catalyse esterification and transesterification reactions (acidolysis, alcoholysis, aminolysis, and interesterification), which makes them attractive catalysts for use in organic syntheses (HASAN et al., 2006).

Lipases can be used to obtain products with high added value for food and other industrial uses, with competitive production costs (ANDUALEMA AND GESSESSE, 2012). The applications of these enzymes also include the production of biosurfactants, biodiesel, and enantiomerically pure intermediates for use in the pharmaceutical, agrochemical, modified oils, and flavourings areas, among others (PATIL et al., 2011).

Many microorganisms produce lipases, including bacteria, yeasts, actinomycetes, and fungi. The bacterial lipase producers include members of the genera *Pseudomonas* (KIRAN et al., 2008), *Bacillus* (ABADA, 2008), *Burkholderia* (SHU et al., 2012), *Staphylococcus* (CHERIF et al., 2011), and *Streptomyces* (LARGE et al., 1999; CHO et al., 2012; MISHRA AND GUPTA, 2014; AYZAZ et al., 2015).

Streptomyces are filamentous, non-pathogenic, Gram-positive bacteria. Isolated from soil, these bacteria are known to synthesize a wide variety of antibiotics and enzymes. Studies have reported the presence of extracellular lipase in antibiotic production media (KIM AND PARK, 2007; EFTHIMIOU, et al., 2008), as well as the production, purification, and characterization of extracellular lipases from *Streptomyces* species (CHO et al., 2012; CADIRCI et al., 2016; AYZAZ et al., 2015). It has also been reported that some lipases from *Streptomyces* seem to be cell-associated, including *Streptomyces clavuligerus* lipase (LARGE et al., 1999).

Due to their easy recovery after production, extracellular lipases are more extensively studied and commercialized than the intracellular or cell-associated lipases. Nevertheless, cell-associated lipases are economically advantageous because they can be obtained at low cost. The biomass can be directly employed as biocatalyst, without requiring isolation and purification steps. Furthermore, the whole-cell lipases can be easily recovered after the reactions, since these are naturally immobilized enzymes (SOLARTE et al., 2014; TALUKDER et al., 2013; ADACHI et al., 2013).

In view of the above, this work was conducted with the aim of evaluating a wild-type *Streptomyces clavuligerus* strain as lipase producer and determining the culture conditions and operational parameters for submerged cultivations in shake flasks and a bench-scale reactor. The location of *S. clavuligerus* lipase was quantitatively identified by measuring the hydrolytic activity of different samples from the whole broth. Considering the aerobic nature of the microorganism, investigation was made of the influence of the type of flask used in the orbital shaker cultivations on enzymatic activity. The effects of carbon source, pH, and temperature on enzyme production were also evaluated. The effects of aeration and agitation on enzyme productivity were assessed using the bench-scale bioreactor. Measurement was made of the catalytic activity of lyophilized whole-cell lipase in hydrolysis and esterification reactions, and biochemical properties such as pH and temperature optima, as well as stability, were also investigated.

4.2 Materials and methods

4.2.1 Materials

Streptomyces clavuligerus strain ATCC 27064 was acquired from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) by Prof. Alberto Colli Badino Junior (DEQ/UFSCar) and was kindly donated for this work in the form of vegetative cells (5.0 g.L⁻¹ dry weight) stored at -80 °C in cryotubes with glycerol (20%, v/v). Malt extract was purchased from Kasvi, pancreatic digest of gelatin (peptone G) from Acumedia, and yeast extract from Himedia. MOPS buffer was obtained from Qhemis. Glycerol and gum arabic were acquired from Synth. Tributyrin, sodium deoxycholate, and p-nitrophenyl palmitate were from Sigma-Aldrich, and Triton X-100 was from Vetec. Soybean molasses was kindly provided by Imcopa S.A. (Araucária, PR, Brazil). Crude soybean flour and soybean oil (Liza brand) were purchased in a local market. All other analytical grade chemicals and solvents were supplied by Synth or Qhemis.

4.2.2 Culture media

The seed medium had the following composition (in g.L⁻¹ distilled water), as described by Ortiz et al. (2007): glycerol, 15.0; peptone G, 10.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄.7H₂O, 0.75; MnCl₂.4H₂O, 0.001; FeSO₄.7H₂O, 0.001; ZnSO₄.7H₂O, 0.001; MOPS buffer, 21.0 (100 mM). The pH was adjusted to 6.8 with 5 M NaOH solution prior to autoclaving at 121 °C for 20 min.

The inoculum medium was composed of 10.0 g.L⁻¹ glycerol, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour, 23.0 g.L⁻¹ soybean oil, 1.2 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.001 g.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0.001 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O, 0.001 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 21.0 g.L⁻¹ MOPS buffer (100 mM), pH 6.8 (MARANESI et al., 2005).

The composition of the standard production medium (SPM) was the inoculum medium used for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* (MARANESI et al., 2005) with slight modifications aimed at inducing the production of lipase.

4.2.3 Standard cultivation of *Streptomyces clavuligerus* in Erlenmeyer flasks

The content of one cryotube (3.5 mL of *S. clavuligerus* ATCC 27064 cell suspension) was added to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of seed medium. After incubation for 24 h at 28 °C, using an orbital shaker (Innova 44, New Brunswick Scientific) at 250 rpm, a 5 mL volume of the seed medium (10%, v/v) was transferred to a 500 mL Erlenmeyer flask containing 45 mL of inoculum medium. Again, after 24 h at 28 °C, with 250 rpm agitation in the orbital shaker, a 5 mL volume of the culture medium was inoculated into a 500 mL flask containing 45 mL of production medium. Cultivations were performed for 72 h at 28 °C, using the orbital shaker at 250 rpm, with flasks being removed at intervals of 12 h for the determination of hydrolytic activity.

4.2.4 Location of lipase

In the study of the location of lipase, measurement was made of the hydrolytic activity (using p-nitrophenyl palmitate as substrate) of whole broth samples from standard cultivations after 60 h in baffled Erlenmeyer flasks. Whole broth samples were centrifuged for 20 min at 12,857 × g and 4 °C for activity assays of the supernatant and pellets resuspended in distilled water at the same volume as the original samples. The resuspended pellet samples were also sonicated to disrupt the cells, followed by measurement of activity using p-nitrophenyl palmitate as substrate. Sonication was performed in an ice bath using a Sonics Vibracell™ at 20 kHz for 15 min (adopting sequential 30 s pulses and pauses). The sonicated samples were also centrifuged for 20 min at 12,857 × g and 4 °C for activity assays of the supernatants.

4.2.5 Culture conditions for *S. clavuligerus* lipase production in Erlenmeyer flasks

Influence of Erlenmeyer flask type

The influence of the type of flask was evaluated by standard cultivations of *Streptomyces clavuligerus* in an orbital shaker, using conventional and baffled Erlenmeyer flasks for all the fermentation steps (reactivation, inoculation, and production).

Effect of carbon source, pH and temperature on lipase production

Based on a 2^3 full factorial design, a set of 8 experiments was constructed using the statistical software STATISTICA 7 to evaluate the potential effects of pH, temperature, and carbon source on the production of *S. clavuligerus* lipase. All conditions were tested in duplicate, and each independent variable was used at two levels, low (-1) and high (+1), as described in Table 4.1.

Table 4.1: Variables and levels of the 2^3 full factorial experimental design.

Code	Variable label	Level	
		-1	+1
X ₁	Carbon source (10 g.L ⁻¹)	Glycerol	Soybean molasses
X ₂	pH	6.8	7.4
X ₃	Temperature (°C)	28	35

The culture conditions for the low level were those used for the standard cultivation of *Streptomyces clavuligerus*, described in Sections 4.2.2 and 4.2.3. For the high level, soybean molasses was tested as carbon source, because it is a low cost by-product and composed of 50-60% carbohydrates (SELLA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2008). The pH 7.4 and the temperature of 35 °C were also used for the high level, because these conditions have been reported to be favourable for *Streptomyces* lipases activity (LARGE et al., 1999; CHO et al., 2012).

Crude soybean flour (20.0 g/L) and soybean oil (23.0 g/L) were used as nitrogen source and lipase inducer, respectively. The other components and concentrations used for the production medium were the same as in the SPM described above. Flasks were removed from the shaker after 36 h for measurement of hydrolytic activity.

Influence of glycerol on *S. clavuligerus* lipase production

Soybean oil and crude soybean flour can also provide carbon sources for the growth of *S. clavuligerus*, instead of glycerol, which could be a repressor of lipase synthesis. Previous work has reported that for the production of clavulanic acid, *S. clavuligerus* only consumes lipids after glycerol exhaustion (ORTIZ et al., 2007). Hence, the influence of glycerol on lipase production was evaluated in three experiments (named PM-1, PM-2, and PM-3) carried out in an orbital shaker at 28 °C and pH 6.8, with stirring at 250 rpm. The production media and nutrient concentrations were as follows: 20.0 g/L crude soybean flour and 23.0 g/L soybean oil (PM-1); 23.0 g/L soybean oil only (PM-2); and 10.0 g/L glycerol, 20.0 g/L crude soybean flour, and 23.0 g/L soybean oil (PM-3). The other components and concentrations were the same as for the SPM. The lipase hydrolytic activity was measured after 12, 24, and 36 h of fermentation.

4.2.6 Standard cultivation of *Streptomyces clavuligerus* in a bench reactor

For the bench-scale bioreactor cultivation, eight baffled 500 mL Erlenmeyer flasks containing 45 mL of inoculum medium (Sections 4.2.2 and 4.2.3) were inoculated with 5 mL of seed medium (Sections 4.2.2 and 4.2.3) and incubated in an orbital shaker at 28 °C and 250 rpm for 24 h. The whole content of the flasks (400 mL) was used to inoculate 3.6 L of standard production medium (SPM – Section 4.2.2), resulting in 4 L of fermentation broth (ORTIZ et al., 2007). The cultivations were conducted in batch mode for 84 h at 28 °C, with stirring at 400 rpm and aeration at 1 vvm, in a 5 L Bioflo 310 or Bioflo Iic bioreactor (New Brunswick Scientific). The pH was manually maintained at 6.8 ± 0.1 by adding 1 M HCl or 1 M NaOH solutions. Samples of 10 mL were withdrawn about every 8 h for measurement of hydrolytic activity.

Standard cultivation without glycerol in the production medium (SPM-G) was also carried out in order to compare with lipase production in the SPM.

4.2.7 Determination of operational parameters for *S. clavuligerus* lipase production in a bench reactor

Effect of aeration and agitation conditions

A 2² factorial design for two independent variables, each at two levels, was employed to evaluate the effect of airflow rate and stirring speed on lipase productivity.

Standard cultivations of *S. clavuligerus* in a bench reactor were performed in triplicate, and 1 vvm aeration and 400 rpm stirring were defined as the “central point” conditions. Different combinations of aeration (0.5 and 1.5 vvm) and stirring (200 and 600 rpm) were assessed. The conditions of aeration and stirring were based on those already reported for cultivation of *Streptomyces* in bench reactor (LARGE et al., 1999; EFTHIMIOU et al., 2008; ORTIZ et al., 2007; LARGE et al., 1998). The composition of the culture media were kept as standard.

4.2.8 Preparation of whole-cell lipase from *Streptomyces clavuligerus*

Biomass was collected by centrifugation ($12,857 \times g$, 30 min at 4 °C) after 36 h standard cultivation with SPM-G in a bench reactor. The cell mass was washed three times with 0.9% (w/v) sodium chloride solution to remove culture medium compounds from the surfaces of the *S. clavuligerus* cells. The washed cell pellets were then resuspended in 0.9% (w/v) sodium chloride solution and stored at -80 °C overnight. The cells were freeze dried in a lyophilizer (Labconco), stored at -20 °C, and named *Streptomyces clavuligerus* whole-cell lipase (*Sc*-WCL). A sample of whole broth was also freeze dried in order to determine the yield of biocatalyst relative to the total cell mass. The hydrolytic potential of *Sc*-WCL was investigated by measuring the hydrolytic activity towards p-nitrophenylpalmitate and tributyrin, as described in Section 4.2.9. The hydrolytic activity of the supernatant samples was also determined in order to quantify the loss of activity during the cell washing steps.

4.2.9 Enzyme activity measurement

Hydrolytic activity was measured by spectrophotometry using p-nitrophenyl palmitate (p-NPP) as substrate, according to Gupta et al. (2002), with slight modifications. The p-NPP substrate (30 mg) was dissolved in 10 mL of isopropanol and 90 mL of phosphate buffer (50 mM, pH 9.0) containing sodium deoxycholate (207 mg) and gum arabic (100 mg), yielding a final concentration of 790 μ M p-NPP. In 100 mL glass vessels, 200 μ L of Triton X-100 was added to 9.6 mL of the substrate solution, pre-warmed at 37 °C, and then mixed with 0.4 mL of suitably diluted enzymatic extract. After 10 min of incubation, aliquots were withdrawn every 2.5 min using pipette tips with cotton filters, and the absorbance was measured at 410 nm. One unit (U) of hydrolytic activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of p-nitrophenol per minute, under the assay conditions.

The hydrolytic activity of the lyophilized whole-cell lipase was measured by titrimetric assay using tributyrin as substrate (BEISSON et al., 2000). The reaction mixture

consisted of 14 mL of distilled water, 5 mL of 100 mM sodium phosphate buffer at pH 9.0, 1 mL of tributyrin, and an amount of whole-cell lipase (75, 100, and 150 mg). The reaction was carried out in a 100 mL glass vessel at 37 °C, under continuous 300 rpm stirring. The butyric acid released was titrated with standard 0.0179 M potassium hydroxide solution at pH 9.0, using a 907 Titrand pH-STAT titrator (Metrohm, Switzerland). Enzyme activity was calculated using the rate of addition of alkali and was expressed as tributyrin units per gram of sample. One tributyrin unit (TBU) of lipase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of butyric acid per minute, under the assay conditions.

4.2.10 Biochemical properties of *Sc*-WCL

Effect of temperature and pH on *Sc*-WCL activity and stability

The optimum temperature for the *Sc*-WCL activity was determined by carrying out the titrimetric assay using tributyrin at different temperatures (35-65 °C), with 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0). The hydrolysis of tributyrin was also performed without the biocatalyst (blank reaction) for all temperatures, to enable subsequent correction of the hydrolytic activity measurements. Relative activity was calculated, considering the maximum lipase activity as 100%. For determination of the temperature stability, 50 mg of *Sc*-WCL were incubated in 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0) for 1 h at 30, 40, 50, and 60 °C. Residual activity was measured by the tributyrin assay (37 °C, pH 10.0) and was calculated considering the initial activity as 100%.

For the pH study, *Sc*-WCL activity was also determined by titrimetric assay at 37 °C in the pH range 6.0-10.7, using 100 mM of different buffers: sodium phosphate buffer for pH 6.0, 7.0, 7.5, and 8.0; and carbonate-bicarbonate buffer for pH 9.2, 10.0, and 10.7. Relative activity was calculated considering the maximum lipase activity as 100%.

Substrate specificity of *Sc*-WCL in esterification and hydrolysis reactions

The esterification activity of *Sc*-WCL was determined according to the methodology described by Paula et al. (2008), which consists of the synthesis of butyl butyrate. The reaction mixture was composed of 1-butanol (0.1 M) and butyric acid (C₄) (0.1 M) in heptane. The reaction was started by the addition of *Sc*-WCL to the reaction mixture (10 mL), which was kept in sealed flasks under 250 rpm stirring, at 37 °C and with 500 mg of molecular sieve. At each predetermined time interval, an aliquot was withdrawn and diluted 1:10 in acetone-ethanol solution to quench the reaction. The acid consumption was

determined by titration with a standard 0.01951 M potassium hydroxide solution at the equivalence point (EP), using the 907 Titrand pH-STAT titrator. One esterification unit (U_{est}) was defined as the formation rate of 1 μmol of butyl butyrate per minute, under the assay conditions. The esterification assay was also performed using oleic acid (C_{18}) for butyl oleate synthesis, under the same conditions described above.

The hydrolytic activity of *Sc*-WCL was measured by titrimetric assay using olive oil (C_{18}) as substrate. The reaction mixture consisted of 13.45 mL of distilled water, 6 mL of 100 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5, 4.55 mL of olive oil, and an amount of whole-cell lipase (100, 200, and 300 mg). The reaction was performed in a 100 mL glass vessel at 37 °C, under continuous 300 rpm stirring. The free fatty acids released were titrated with standard 0.01871 M potassium hydroxide solution at pH 7.5, using the 907 Titrand pH-STAT titrator. Enzyme activity was calculated using the rate of addition of alkali and was expressed as units per gram of sample. One unit (U) of lipase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μmol of free fatty acids per minute, under the assay conditions. The hydrolysis assay was also carried out using tributyrin (C_4) as substrate, as described in Section 4.2.9, but at pH 7.5.

4.3 Results and discussion

4.3.1 Location of *S. clavuligerus* lipase

The hydrolytic activities obtained for the whole broth, supernatant, resuspended pellet, sonicated resuspended pellet, and supernatant from the sonicated resuspended pellet are shown in Table 4.2.

Table 4.2: Hydrolytic activities in samples from *S. clavuligerus* cultivation.

Samples*	Hydrolytic activity ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)**
Whole broth	4.04 ± 0.03
Resuspended pellet	2.62 ± 0.21
Supernatant	1.39 ± 0.18
Sonicated resuspended pellet	1.87 ± 0.29
Supernatant from sonicated resuspended pellet	1.15 ± 0.05

* Obtained after 60 h from cultivations with standard production medium in baffled Erlenmeyer flasks.

** p-NPP assay, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0), 37°C.

Hydrolytic activity was detected in all the samples, including the cell-free supernatant samples. More than 60% of the hydrolytic activity measured in whole broth (4.04 U.mL⁻¹) was detected in the resuspended pellets (2.62 U.mL⁻¹), while the hydrolytic activity in the supernatant samples (1.39 U.mL⁻¹) corresponded to around 34% of the total activity. These results were in agreement with previous findings that *Streptomyces clavuligerus* lipase was mainly found in whole broth samples, and that its activity was associated with the cells (LARGE et al., 1999).

In the case of the samples subjected to cell disruption, the activity recovered in the supernatant from the sonicated resuspended pellet (1.15 U.mL⁻¹) corresponded to 62% of the total activity obtained before centrifugation (1.87 U.mL⁻¹). Hence, cell disruption by sonication did not release a high level of hydrolytic activity, possibly because *Streptomyces clavuligerus* is a Gram-positive bacterium whose thick cell wall might not have been ruptured under the sonication conditions used. Moreover, sonication may have had a detrimental effect on the lipase, since the hydrolytic activity obtained for the sonicated resuspended pellet was 1.87 U.mL⁻¹, around 30% less than before cell disruption (2.62 U.mL⁻¹).

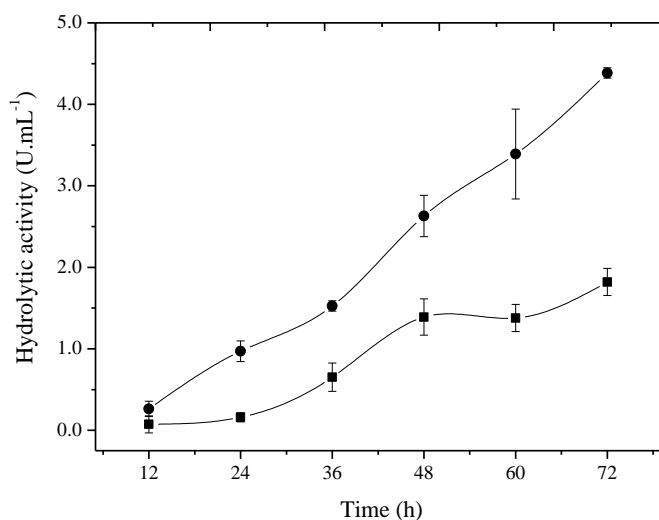
Considering that the lipase hydrolytic activity was mainly observed in the pellet samples and that sonication did not seem to be an effective strategy for easy enzyme recovery, it was decided to focus on the production of a whole-cell biocatalyst, i.e., the whole-cell lipase from wild-type *Streptomyces clavuligerus*, which had not yet been reported. For convenience, the hydrolytic activity of whole broth samples was monitored throughout the cultivations of *S. clavuligerus*.

4.3.2 Culture conditions for *S. clavuligerus* lipase production in Erlenmeyer flasks

Influence of Erlenmeyer flask type

During 72 h fermentation, *Streptomyces clavuligerus* lipase production was higher in baffled Erlenmeyer flasks than in conventional Erlenmeyer flasks. The maximum hydrolytic activity in baffled flasks was 4.39 U.mL⁻¹ for 72 h fermentation, 2.4 times greater than the maximum hydrolytic activity achieved in conventional flasks (Figure 4.1). The baffles present on the internal wall of the flask promote chaotic mixing, preventing the formation of vortex and cells aggregation, and improving the homogeneity of the culture medium (SOCCOL et al., 2013). Furthermore, they serve to maximize gas transfer, which favoured lipase production by *S. clavuligerus*, an aerobic microorganism (NETO et al., 2005).

Figure 4.1: Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 72 h fermentation of *Streptomyces clavuligerus* at 28 °C in conventional Erlenmeyer flasks (■) and baffled Erlenmeyer flasks (●) containing standard production media (SPM). Lipase hydrolytic activity of whole broth samples measured by p-NPP assay, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0), 37°C. Results expressed as triplicate means \pm s.d.



Given these results, baffled Erlenmeyer flasks were used in subsequent studies to define the culture conditions for lipase production, as well as for the initial steps of lipase production in a bioreactor.

Effect of carbon source, pH and temperature on the *S. clavuligerus* lipase

The results obtained from the 2³ factorial design experiments (R_1 and R_2) are summarised in Table 4.3.

It is interesting to note that no lipase hydrolytic activity was measured in the broth of *S. clavuligerus* grown at 35 °C, even though lipase activity was measured at this temperature. This is a relevant finding, since the *S. clavuligerus* lipase is a cell-associated enzyme. In conclusion, hydrolysis reactions catalysed by whole-cell lipase may be performed at 35–37 °C, while the microorganism does not grow under these conditions.

Table 4.3: 2^3 factorial design matrix for screening of the effects of pH, temperature and carbon source on lipase production by *S. clavuligerus*.

Run	X_1 Carbon source	X_2 pH	X_3 Temperature	Lipase hydrolytic activity (U.mL ⁻¹)*	
				R_1	R_2
1	-1 (Glycerol)	-1 (6.8)	-1 (28)	2.78	2.62
2	1 (Soybean molasses)	-1 (6.8)	-1 (28)	2.18	2.18
3	-1 (Glycerol)	1 (7.4)	-1 (28)	1.79	1.51
4	1 (Soybean molasses)	1 (7.4)	-1 (28)	1.10	1.26
5	-1 (Glycerol)	-1 (6.8)	1 (35)	0.00	0.00
6	1 (Soybean molasses)	-1 (6.8)	1 (35)	0.00	0.00
7	-1 (Glycerol)	1 (7.4)	1 (35)	0.00	0.00
8	1 (Soybean molasses)	1 (7.4)	1 (35)	0.00	0.00

* Lipase hydrolytic activity of whole broth samples was measured by p-NPP assay, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 9.0), 37°C. All assays were performed in duplicate (R_1 and R_2).

The results of variance analysis (90% confidence interval) confirmed that the change from low level to high level, not only for temperature but for the three factors, had a negative effect on lipase production (Table 4.4). In other words, the replacement of glycerol by soybean molasses (a low cost by-product), the increase of pH from 6.8 to 7.4, and the increase of temperature from 28 to 35 °C had detrimental effects on lipase hydrolytic activity.

Table 4.4: Estimated effects on lipase hydrolytic activity from the 2^3 full factorial design ($\alpha=0.10$).

Variable	Effect	p-values
X_1 (Carbon source)	-0.24750	0.000574
X_2 (pH)	-0.51250	0.000003
X_3 (Temperature)	-1.92750	0.000000

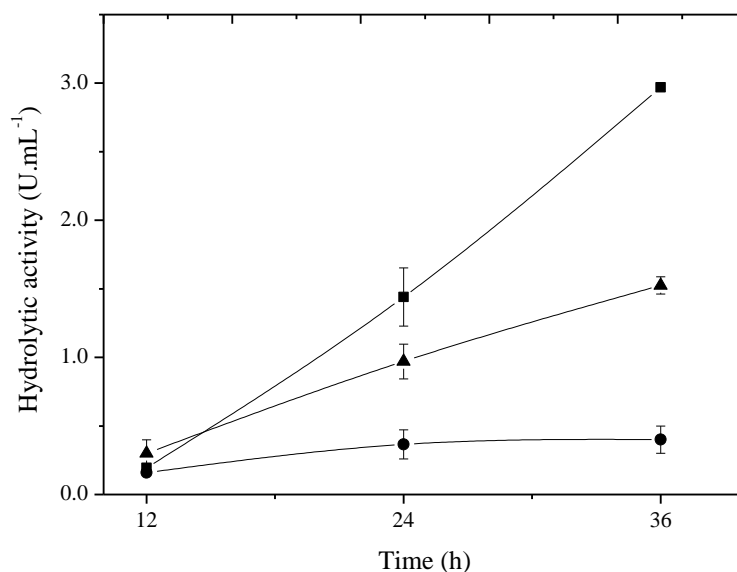
Further research should be undertaken to determine the optimum conditions for pH, temperature, and glycerol concentration, for example employing a 2^3 full factorial central composite rotary design (CCRD), but this was beyond the scope of this work. Therefore, the

standard conditions were maintained for further enzyme production assays: 10 g/L glycerol as carbon source, pH 6.8, and cultivation temperature of 28 °C.

Influence of glycerol on lipase production by S. clavuligerus

Temporal profiles of the lipase hydrolytic activities of the whole broth samples during 36 h of fermentation using three different production media (PM-1, PM-2, and PM-3) are shown in Figure 4.2.

Figure 4.2: Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 36 h of cultivations of *S. clavuligerus* in baffled Erlenmeyer flasks (orbital shaker, pH 6.8, 28 °C): (■) PM-1, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour and 23.0 g.L⁻¹ soybean oil; (●) PM-2, 23.0 g.L⁻¹ soybean oil only; (▲) PM-3, 10.0 g.L⁻¹ glycerol, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour, and 23.0 g.L⁻¹ soybean oil. Hydrolytic activity was measured by p-NPP assay. Results are expressed as triplicate means ± s.d.



It can be seen that the absence of glycerol had a positive effect on lipase production by *S. clavuligerus*. After 36 h of cultivation, the hydrolytic activity in the medium without glycerol (PM-1) was nearly two times higher than in the PM-3 medium, with values of 3.0 and 1.5 U.mL⁻¹, respectively. The slower production of lipase in the PM-3 medium could have been due to the initial use of glycerol as carbon source by the microorganism, delaying the lipase production. In the PM-1 medium, in which the lipid carbon source was probably used first, lipase hydrolytic activity was detected more rapidly. In the PM-3

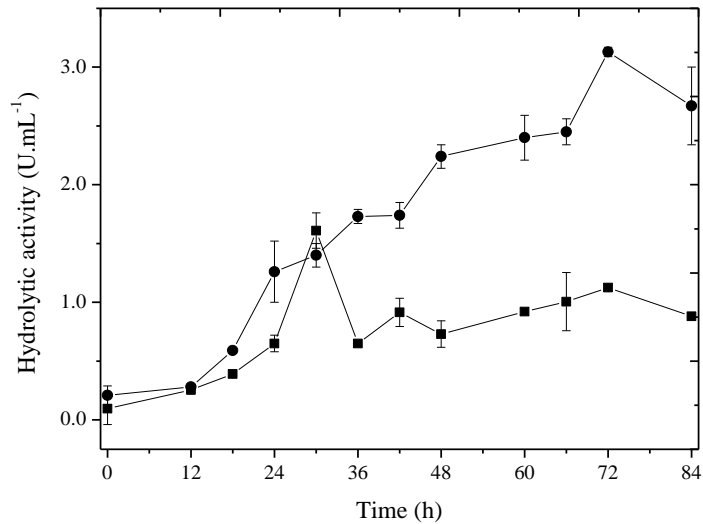
medium, a similar level of lipase activity ($\sim 3.0 \text{ U.mL}^{-1}$) was only observed after 48 h fermentation (Figure 4.1). These results agree with previously reported findings showing a relation between glycerol and a delay in lipase activity detection or even lipase production repression (LARGE et al., 1999; ORTIZ et al., 2007). The low lipase production observed in the PM-2 medium can be explained by the absence of soybean flour as nitrogen source, which possibly had a negative effect on *S. clavuligerus* growth and, consequently, on lipase synthesis. The lipase activity in the PM-2 medium remained at around 0.40 U.mL^{-1} throughout the fermentation.

4.3.3 Standard cultivation of *S. clavuligerus* in a bench reactor

Cultivations in a bioreactor were motivated by the results obtained from the study of the effect of the type of Erlenmeyer flask, which showed the importance of agitation for lipase production by *S. clavuligerus*. In bench reactors, it is possible to achieve more effective control of operating variables such as aeration, agitation, pH, and temperature. Therefore, two cultivations were carried out in order to evaluate lipase production in the bench reactor, with (SPM) and without (SPM-G) glycerol in the production medium.

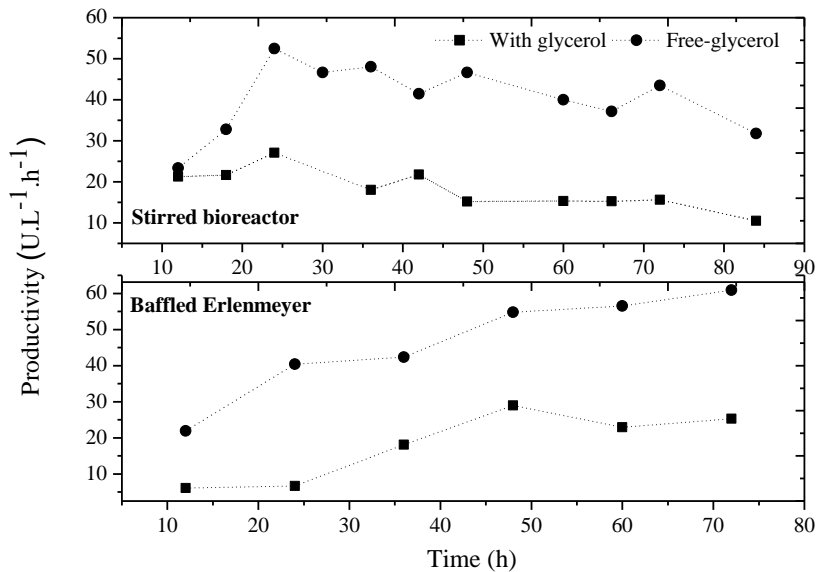
Higher lipase production was obtained in the medium without glycerol (Figure 4.3), corroborating the results of the rotary shaker cultivations. The hydrolytic activities in glycerol-free medium were on average approximately two times higher than those in medium containing glycerol.

Figure 4.3: Lipase hydrolytic activity of whole broth samples during 84 h of fermentation of *S. clavuligerus* in a bench reactor at 28 °C and pH 6.8, using production media with 10.0 g/L glycerol (■) and without glycerol (●). Experiments were performed in duplicate and hydrolytic activity was measured by p-NPP assay.



When a stirred bioreactor and glycerol-free medium were used, maximum productivity ($52.5 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) was reached after 24 h, while similar productivity ($54.8 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) in the baffled shaker flasks was only reached after 48 h (Figure 4.4).

Figure 4.4: Lipase productivities of *S. clavuligerus* cultivated at 28 °C and pH 6.8 in media with or without glycerol, in the stirred bioreactor or in baffled Erlenmeyer flasks.



Temporal profiles showed that the lipase productivity increased during the cultivations in baffled Erlenmeyer flask. However, the lipase productivity in the bioreactor decreased when *S. clavuligerus* cells were exposed to shear forces for a long period of time, probably due to fragmentation of the *S. clavuligerus* hyphae, which reduced the ability of the microorganism to produce lipase (LARGE et al., 1998).

4.3.4 Operational parameters for *S. clavuligerus* lipase production in the bench reactor

Effect of aeration and agitation conditions

The effects on lipase production of aeration and agitation in standard cultivations carried out in the bench reactor were evaluated using different experimental combinations, as shown in Table 4.5. The response variable adopted was the maximum lipase productivity obtained for 120 h of cultivation.

Table 4.5: Maximum productivity of *S. clavuligerus* lipase obtained for 120 h in bioreactor cultivations at 28 °C and pH 6.8, using standard production medium under different conditions of agitation and aeration.

Run	Coded values and actual values		Maximum productivity (U.L ⁻¹ .h ⁻¹)*
	X_4	X_5	
1	-1 (200)	-1 (0.5)	8.75
2	-1 (200)	1 (1.5)	14.8
3	1 (600)	-1 (0.5)	46.4
4	1 (600)	1 (1.5)	50.0
5	0 (400)	0 (1.0)	51.9
6	0 (400)	0 (1.0)	53.7
7	0 (400)	0 (1.0)	56.4

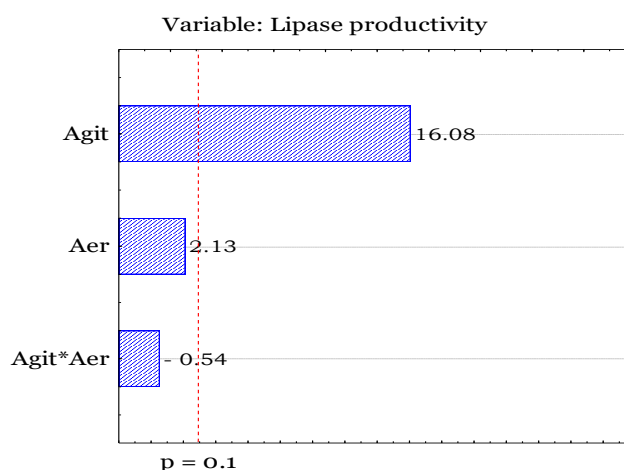
Actual variables are given in parentheses. X_4 and X_5 are stirrer speed (rpm) and airflow rate (vvm), respectively.

* Ratio of lipase activity of whole broth samples in U.L⁻¹ and cultivation time.

Analysis of the lipase productivities using a 2² factorial design showed that stirring and aeration rate both exhibited positive effects on productivity (Figure 4.5). As *S. clavuligerus* is a filamentous bacterium, the culture broth presents non-Newtonian rheological behavior during the fermentation, making oxygen transfer from the gas to the liquid phase difficult and consequently restricting microbial growth and enzyme production (GOUVEIA et al., 2000).

By increasing the stirring and aeration rates, the oxygen transfer rate was increased, hence reducing possible reaction limitations and enhancing enzyme productivity. Nonetheless, the results of variance analysis (90% confidence interval) showed that only the stirring rate had a statistically significant effect on productivity (Figure 4.5).

Figure 4.5: Pareto chart of standardized effects of aeration (Aer), agitation (Agit), and their interaction on *S. clavuligerus* lipase productivity at 28 °C and pH 6.8, for 120 h of cultivation.



Therefore, the cultivation conditions suitable for whole-cell lipase production by *Streptomyces clavuligerus* in the bench reactor were glycerol-free production medium, pH 6.8, 28 °C, agitation at 400 rpm, and aeration at 1 vvm.

4.3.5 Preparation of whole-cell lipase from *S. clavuligerus* (*Sc*-WCL)

The *Sc*-WCL biocatalyst was separated from whole broth containing 17.4 g of *Sc*-WCL per liter, washed with distilled water, and lyophilized. During the washing step, there was a loss of 25% of the hydrolytic activity initially measured in the whole broth, probably due to the removal of cell-bound and/or cell-adsorbed lipases.

The hydrolytic activities of *Sc*-WCL, measured at 37 °C and pH 9.0, were $330 \pm 86 \text{ U.g}^{-1}$ (using p-NPP as substrate) and $6.6 \pm 0.8 \text{ TBU.g}^{-1}$ (using tributyrin as substrate). Comparing these activities with those of commercial lipase preparations, the p-NPP activity of *Sc*-WCL was 100-fold higher than the preparation of *Thermus thermophilus* lipase marketed as a mixture of intracellular lipases by Sigma-Aldrich. The TBU activity of *Sc*-WCL was of the same order of magnitude as the immobilized lipase from *Rhizopus niger* (15 TBU.g⁻¹), marketed by ChiralVision. The high specific activities of *Sc*-WCL make it

attractive for use as a biocatalyst, because the lipase does not need to be isolated from the cells and purified.

4.3.6 Biochemical properties of *Sc*-WCL

Effect of temperature and pH on Sc-WCL activity and stability

The temperature and pH profiles showed that *Sc*-WCL was more active at 60 °C (Figure 4.6) and pH 10.7 (Figure 4.7). Previous studies reported that *Streptomyces* extracellular lipases were more active at temperatures between 45 and 55 °C and in the pH range 8.0-9.0 (AYAZ et al., 2015; CÔTÉ AND SHARECK, 2008).

Sc-WCL was shown to be stable at 30-40 °C and retained more than 80% of the initial activity after 1 h incubation at pH 10.0 (Figure 4.6), which are attractive features for industrial applications. Lipases that are active at alkaline pH (8 to 11) have good potential for use in enzymatic detergent powders and liquids, since such pH values are obtained in washing operations (JAEGER et al., 1994; HASAN et al., 2006).

Figure 4.6: Effect of temperature on *Sc*-WCL hydrolytic activity (■) and stability for 1 h (□). Relative activity was measured by titrimetric assay using tributyrin as substrate, for different temperatures in the range 35-65 °C, with 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0). Residual activity was also measured by tributyrin assay at 37 °C, with 100 mM carbonate-bicarbonate buffer (pH 10.0), after 1 h incubation at temperatures ranging between 30 and 60 °C, at pH 10.0. Results are expressed as triplicate means \pm s.d.

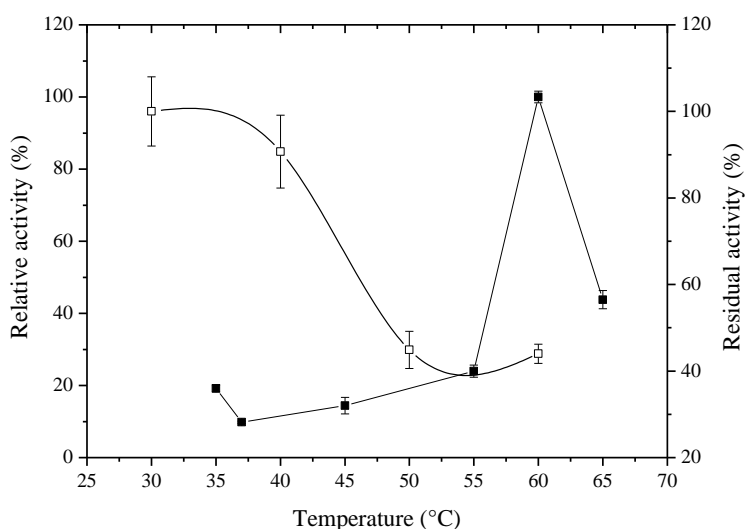
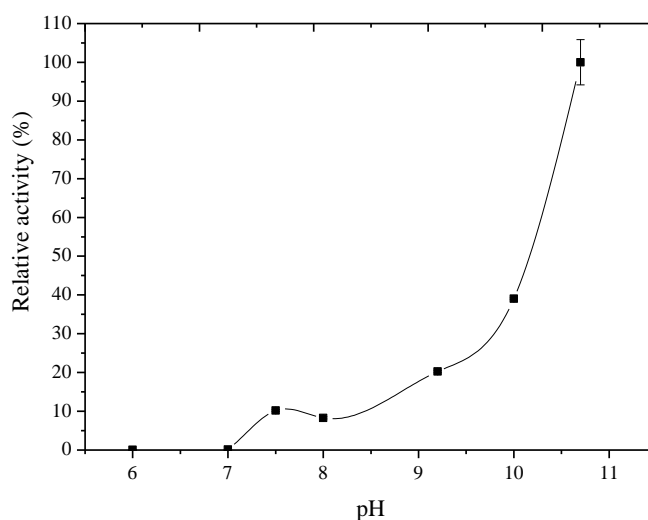


Figure 4.7: Effect of pH on *Sc*-WCL hydrolytic activity. Relative activity was measured at 37 °C using tributyrin as substrate, with 100 mM of different buffers: sodium phosphate buffer for pH 6.0, 7.0, 7.5, and 8.0; and carbonate-bicarbonate buffer for pH 9.2, 10.0, and 10.7. Results are expressed as triplicate means \pm s.d.



Substrate specificity of Sc-WCL in esterification and hydrolysis reactions

The hydrolytic activities of *Sc*-WCL were measured at 37 °C and pH 7.5, for hydrolysis of tributyrin (C₄) and olive oil (C₁₈). The biocatalyst seemed to prefer long-chain substrates, because the highest hydrolytic activity was observed for olive oil hydrolysis (Table 6). This finding was in agreement with previous studies of *Streptomyces* lipases, which showed preference for C₁₆-C₁₈ substrates in hydrolysis reactions (CHO et al., 2012; CÔTÉ AND SHARECK, 2008).

The esterification activities of *Sc*-WCL were measured at 37 °C by synthesis of butyl butyrate from butyric acid and butanol (1:1 molar ratio) and synthesis of butyl oleate from oleic acid and butanol (1:1 molar ratio), both in heptane. The results showed that in an organic medium, *Sc*-WCL preferred short-chain substrates, because the esterification activity was nearly 8 times higher in the butyl butyrate synthesis than in the butyl oleate synthesis (Table 4.6). This revealed a potential application of the biocatalyst in the synthesis of esters of fatty acids, which are widely used in various industrial sectors producing foods, flavourings, biolubricants, and biofuels.

Table 4.6: Hydrolytic and esterification activities of *Sc*-WCL towards short- and long-chain substrates.

Substrate	Hydrolytic activity (TBU.g ⁻¹) ¹ (U.g ⁻¹) ²	Esterification activity (U _{est} .g ⁻¹) ³
C ₄ (tributylin)	2.95 ± 0.24	42.8 ± 1.7
C ₁₈ (olive oil)	4.16 ± 0.42	5.39 ± 0.92

¹ TBU = Activity at 37°C, pH 7.5, hydrolysis of tributyrin.

² U = Activity at 37°C, pH 7.5, hydrolysis of olive oil.

³ U_{est} = Esterification unit, defined as the formation rate of 1 μmol of butyl butyrate or butyl oleate per min at 37 °C.

4.4 Conclusion

This work showed that wild-type *Streptomyces clavuligerus* is a producer of alkaline lipase that is mainly associated with the cells. This finding indicates the use of *S. clavuligerus* whole-cell lipase (*Sc*-WCL) as a biocatalyst. For this purpose, the best conditions for cultivation of *S. clavuligerus* in baffled Erlenmeyer flasks were a production medium without glycerol, pH 6.8, and 28 °C, which resulted in lipase hydrolytic activity of around 3,000 U.L⁻¹ after 36 h in an orbital shaker. Fermentations in a bench reactor, using a glycerol-free production medium, stirring at 400 rpm, and an aeration rate of 1 vvm, resulted in maximum lipase productivity of 52.5 U.L⁻¹.h⁻¹ after 24 h cultivation, while similar productivity (54.8 U.L⁻¹.h⁻¹) using the orbital shaker was only achieved after 48 h. *Sc*-WCL showed promising potential for use as a biocatalyst in the hydrolysis of long-chain triglycerides, as well as in the esterification of short-chain fatty acids. *Sc*-WCL has potential as an ingredient in industrial detergent formulations, due to the activity and stability of the lipase at 30-40 °C, the alkalinity of washing solutions, and the low cost of enzyme preparation.

4.5 Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by the Brazilian foundations CNPq (grant #142128/2012-0) and CAPES. The authors also thank Prof. Alberto Colli Badino Junior for donation of the *S. clavuligerus* ATCC 27064 strain.

4.6 References

- ABADA, E.A.E. Production and characterization of a mesophilic lipase isolated from *Bacillus stearothermophilus* AB-1. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, vol. 11, p. 1100–1106, 2008.
- ADACHI, D.; KOH, F.; HAMA, S.; OGINO, C.; KONDO, A. A robust whole-cell biocatalyst that introduces a thermo- and solvent-tolerant lipase into *Aspergillus oryzae* cells: Characterization and application to enzymatic biodiesel production. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 52, p. 331–335, 2013.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology (Faisalabad, Pakistan)**, vol. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.
- AYAZ, B.; UGUR, A.; RUKIYE, B. Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7 for biodiesel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 4, p. 103-108, 2015.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, p. 133-153, 2000
- CADIRCI, B. H.; YASA, I.; KOCYIGIT, A. *Streptomyces* sp. TEM 33 possess high lipolytic activity in solid state fermentation in comparison with submerged fermentation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 46, n. 1, p. 23-29, 2016.
- CHERIF, S.; MNIF, S.; HADRICH, F.; ABDELKAFI, S.; SAYADI, S. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. **Lipids in Health and Disease**, vol. 10, p. 221-228, 2011.
- CHO, S. S.; PARK, D. J.; SIMKHADA, J. R.; HONG, J. H.; SOHNG, J. K.; LEE, O. H.; YOO, J. C. A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 35, p. 227–234, 2012.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Enzyme Microbial Technology**, vol. 42, p. 381-388, 2008.
- EFTHIMIOU, G.; THUMSER, A. E.; AVIGNONE-ROSSA, C. A. A novel finding that *Streptomyces clavuligerus* can produce the antibiotic clavulanic acid using olive oil as a sole carbon source. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 105, p. 2058–2064, 2008.
- GOUVEIA, E. R.; BADINO JR., A. C.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C. O. Studies on the rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 17, n. 4-7, p. 827–834, 2000.
- GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. **Analytical Biochemistry**, vol. 311, p. 98–99, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B. W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **Microbiology Reviews**, vol. 15, p. 29-63, 1994.

KIM, H. S.; PARK, Y. I. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 17, n. 10, p. 1638-1644, 2007.

KIRAN, G. S.; SHANMUGHAPRIYA, S.; JAYALAKSHMI, J.; SELVIN, J.; GANDHIMATHI, R.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; et al. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 31, p. 483-492, 2008.

LARGE, K. P.; MIRJALILI, N.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A.P. Lipase activity in *Streptomyces*. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 25, p. 569-575, 1999.

LARGE, K. P.; ISON, A. P.; WILLIAMS, D. J. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Biotechnology**, vol. 63, p. 111-119, 1998.

MARANESI, G. L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 21, p. 509-514, 2005.

MISHRA, S. AND GUPTA, N. Inducers for the enhanced production of lipase by *Streptomyces* isolated from mangrove ecosystem. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, vol. 3, n. 11, p. 370-376, 2014.

NETO, A. B.; HIRATA, D. B.; CASSIANO FILHO, L. C. M.; BELLÃO, C.; BADINO JÚNIOR, A. C.; HOKKA, C. O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 22, n. 4, p. 557-563, 2005.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 40, p. 1071-1077, 2007.

PATIL, K. J.; CHOPDA, M. Z.; MAHAJAN, R. T. Lipase biodiversity. **Indian Journal of Science and Technology**, vol. 4, n. 8, p. 971-982, 2011.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, vol. 31, p. 35-40, 2008.

SELLA, S. R. B. R.; GUIZELINI, B. P.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Lab-scale production of *Bacillus atrophaeus*' spores by solid state

fermentation in different types of bioreactors. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 52, p. 159-170, 2009.

SHU, Z. Y.; WU, J. G.; CHENG, L. X.; CHEN, D.; JIANG, Y. M.; LI, X.; HUANG, J. Z. Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 166, p. 536–548, 2012.

SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J. L.; et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, vol. 99, p. 8156–8163, 2008.

SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**. Florida: CRC Press Taylor & Francis Group, 2013. 486 p.

SOLARTE, C.; YARA-VARÓN, E.; ERAS, J.; TORRES, M.; BALCELLS, M.; CANELA-GARAYOA, R. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 100, p. 78-83, 2014.

TALUKDER, M. M. R.; LEE, H. Z. S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L.C.; WARZECHA, D.; WU, J. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 89, p. 108-113, 2013.

Capítulo 5 – Aplicação da lipase “whole-cell” de *Streptomyces clavuligerus* na síntese de butirato de butila

Neste capítulo, são abordados os estudos relacionados à aplicação da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* na síntese de butirato de butila em meio orgânico.

O éster butirato de butila é um importante aditivo amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos. Por isso, a síntese de butirato de butila foi usada como modelo para estudar a viabilidade de aplicação do biocatalisador “whole-cell” de *Streptomyces* na produção de ésteres.

Inicialmente, avaliou-se a estabilidade da lipase “whole-cell” em meio orgânico. Em seguida, experimentos para a determinação da razão molar de ácido/álcool e quantidade de biocatalisador que resultassem em maior rendimento em éster foram realizados. Além disso, investigou-se a estabilidade operacional do biocatalisador em bateladas repetidas.

As metodologias empregadas nos estudos bem como os resultados de desempenho da lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* na síntese de butirato de butila estão apresentados neste capítulo, organizado na forma de artigo científico.

Synthesis of butyl butyrate catalyzed by whole-cell lipase from *Streptomyces clavuligerus*

ABSTRACT: Lipase associated to the *Streptomyces clavuligerus* cells (*Sc*-WCL) was used in the butyl butyrate synthesis by direct esterification of butanol and butyric acid in heptane at 37 °C. The stability of *Sc*-WCL in organic medium and the effects of substrate molar ratio acid:alcohol (1: 1, 1: 2, 1: 5, 2: 1 and 5: 1) and biocatalyst loading (0.5-3.0 wt.%) on esterification yield were investigated. The stoichiometric substrate molar ratio (1:1) and the lowest amount of biocatalyst (0.5 wt.%) were better operational conditions to produce the ester. The progress of the butyl butyrate synthesis catalyzed by 0.5 and 1.0 wt.% of *Sc*-WCL showed similar profiles of ester yield. The maximal ester yield using biocatalyst loading 0.5 wt.% was 85% after 8 h of reaction; however, ester yield above 80% was already reached after 3 h of reaction. The stability of the biocatalyst in repeated batches was also monitored. *Sc*-WCL showed very low operational stability, as indicated by the low ester yield in the second batch (3.4%). Despite of the low stability for biocatalyst recyclability, the whole-cell lipase presented potential of applicability in organic synthesis, because the biocatalyst showed high tolerance in organic medium and it was obtained directly by fermentation without costly and time-consuming steps of purification and immobilization.

Keywords: Whole-cell lipase; *Streptomyces clavuligerus*; butyl butyrate synthesis; batch reactor; operational stability.

5.1 Introduction

Fatty acids esters, particularly butyrate esters, are important flavoring additives widely used in food, pharmaceutical and cosmetics. The butyl butyrate is the predominant ester present in pineapple flavor (LORENZONI et al., 2012) and apricot (CALVALCANTE et al., 2015). The high demand for butyl butyrate in food, beverage and pharmaceutical industries is due to the sweet fruity aroma that this ester confers to the products (SANTOS and CASTRO, 2006).

The Fischer esterification, a chemical reaction between a carboxylic acid and an alcohol in the presence of an acid catalyst and under heating, is widely used in the industrial production of esters. In these processes, the mineral acids are used as catalysts, which results in generation of a large amount of acid waste, requiring suitable treatment before disposal (YADAV and RAHUMAN, 2002). Besides the chemical catalysts, lipases may be used as environmentally friendly catalysts to produce “natural” esters by enzymatic esterification or transesterification (SALLEH et al., 2016).

The synthesis of butyl butyrate by enzymatic route has been successfully reported, reaching ester yields above 90% (SALLEH et al., 2016; MATTE et al., 2016; KOPP et al., 2015; MARTINS et al., 2013; MENDES et al., 2013). However, the most lipases used in the esters syntheses are immobilized enzymes on solid supports commercially available. These immobilized biocatalysts are unattractive in industrial application due to their high cost, mainly when large amounts of biocatalyst are required to produce low-value products (RIBEIRO et al., 2011).

Whole-cell lipases (WCL) produced by microorganisms have proved to be an attractive alternative to overcome the disadvantages of the use of commercial lipases (free or immobilized) in industrial processes (SOLARTE et al., 2014; BRAULT et al., 2014; SHU et al., 2012). WCL are intracellular lipases that remain associated to the cells, internally or adsorbed (TALUKDER et al., 2013).

Whole-cell biocatalysts have several advantages under industrial point of view when compared to the free extracellular enzymes. As these biocatalysts are naturally immobilized enzymes, they are used in continuous or repeated processes. Besides, the direct utilization of the biomass as biocatalyst avoids further time-consuming and costly purification and immobilization steps (SCHÜÜRMAN et al., 2014). Some works have reported the use

of WCL for biodiesel production (ADACHI et al., 2013; TALUKDER et al., 2013), ester synthesis (WANG et al., 2007), and oil processing (HLAVSOVA et al., 2009).

Therefore, this work aimed to produce butyl butyrate, an important flavour ester widely applied in food industry, using a novel whole-cell lipase from a wild-type *Streptomyces clavuligerus* (*Sc*-WCL) as biocatalyst. Main reaction parameters, such as molar ratio acid/alcohol, reaction time, and biocatalyst loading were evaluated to establish the reaction conditions of maximum conversion. In addition, the operational stability of the *Sc*-WCL in repeated batches and time course conversion of butyric acid into butyl butyrate were investigated.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Materials

Streptomyces clavuligerus strain ATCC 27064 (5.0 g.L⁻¹ dry weight vegetative cells) was stored at -80 °C in cryotubes (glycerol 20%, v/v). Malt extract was purchased from Kasvi®, pancreatic digest of gelatin (peptone G) from Acumedia®, yeast extract from Himedia®. MOPS buffer was obtained from Qhemis®. Butanol anhydrous, heptane and tributyrin were purchased from Sigma-Aldrich. Butyric acid was obtained from Aldrich Chemistry and molecular sieves 3 Å from Acros organics. Crude soybean flour and soybean oil Liza® were acquired at local market. All other chemicals and solvents were also supplied by Synth® and Qhemis® and were of analytical grade reagent.

5.2.2 Cultivation of *S. clavuligerus* in a 5 L bioreactor and preparation of whole-cell lipase (*Sc*-WCL)

The contents of cryotubes (3.5 mL of *S. clavuligerus* cell suspension) were added into two 500 mL-baffled Erlenmeyer flasks containing 50 mL of sterilized reactivation medium. The flasks were incubated at 28 °C for 24 h in an orbital shaker (New Brunswick Scientific Innova®44) under 250 rpm stirring. The reactivation medium presented the following composition (in g.L⁻¹ distilled water), as described by Ortiz et al. (2007): glycerol, 15.0; peptone G, 10.0; malt extract, 10.0; yeast extract, 1.0; K₂HPO₄, 2.5; MgSO₄·7H₂O, 0.75; MnCl₂·4H₂O, 0.001; FeSO₄·7H₂O, 0.001; ZnSO₄·7H₂O, 0.001; MOPS buffer, 21.0 (100 mM). The pH was adjusted to 6.8 with a 5M NaOH solution before to be autoclaved at 121°C for 15 min.

Aliquots of 5 mL of the reactivation medium (10% v/v) were transferred to eight 500 mL-baffled flasks containing 45 mL of inoculum medium, which were also incubated at 28 °C and 250 rpm for 24 h. The inoculum was composed by 10.0 g.L⁻¹ glycerol, 20.0 g.L⁻¹ crude soybean flour, 23.0 g.L⁻¹ soybean oil, 1.2 g.L⁻¹ K₂HPO₄, 0.001 g.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O, 0.001 g.L⁻¹ FeSO₄.7H₂O, 0.001 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O, 21.0 g.L⁻¹ MOPS buffer (100 mM), pH 6.8 (MARANESI et al., 2005).

The whole content of the eight flasks (400 mL) was used to inoculate 3.6 L of production medium. The composition of the production medium was equal to the inoculum medium, except for the lack of glycerol. The batchwise cultivation was conducted at 28 °C, 400 rpm stirring speed and 1 vvm aeration in a 5-L Bioflo IIC bioreactor (New Brunswick Scientific) for 36 h. The pH was manually maintained at 6.8 ± 0.1 by adding 1 M HCl or 1 M NaOH solution.

The cell biomass was collected by centrifugation (12,857 × g, 30 min at 4 °C), washed three times with 0.9% (w/v) sodium chloride solution, freeze-dried in a lyophilizer Labconco®, and used as whole-cell lipase (*Sc*-WCL). *Sc*-WCL contained 11.3 TBU/g (tributylin assay, pH 10.0, 37 °C).

5.2.3 Activity measurement of *Sc*-WCL

The lipase hydrolytic activity was determined by titrimetric assay using tributyrin as substrate (BEISSON et al., 2000). The reaction mixture consisted of 16.5 mL of distilled water, 6 mL of 100 mM carbonate-bicarbonate buffer pH 10.0, 1.5 mL of tributyrin, and 50 mg of whole-cell lipase. The reaction was carried out in a 100 mL bioreactor at 37 °C, under continuous agitation (300 rpm). The released butyric acid was titrated with standard 0.0189 M potassium hydroxide solution in a 907 Titrand pH-stat (Metrohm–Switzerland) settled at pH 10.0. Enzyme activity was expressed as tributyrin units per gram of sample. One tributyrin unit (TBU) of lipase activity was defined as the enzyme amount that releases 1 μmol of butyric acid per minute under the assay conditions.

5.2.4 Effect of solvents on *Sc*-WCL activity

The effect of butanol and heptane on *Sc*-WCL activity was investigated by incubating the *Sc*-WCL (50 mg) for 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 14 h and 24 h at 37 °C, 200 rpm, in 2 mL of butanol solution 0.1 M prepared in heptane. Residual activity was measured

by titrimetric assay using tributyrin as substrate (Section 5.2.3) and the biocatalyst, which was recovered by centrifugation ($12,857 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min) after incubation time.

5.2.5 Synthesis of butyl butyrate using *Sc*-WCL

Standard esterification reaction using *Sc*-WCL was carried out in 25 mL-closed amber glass flask with plastic seal using heptane as organic solvent in a reaction volume of 10 mL. The reaction medium for butyl butyrate synthesis was composed by the mixture of butanol 0.1 M with butyric acid 0.1 M (molar ratio 1:1), followed by the addition of *Sc*-WCL (1.0 wt.%). The reaction mixture was incubated for 6 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm stirring, and with 1 g of a 3 \AA molecular sieves to remove water produced during the esterification reaction (ABBAS & COMEAU, 2003). The effect of substrate molar ratio on ester conversion was assessed by varying the molar ratio butyric acid: butanol in the reaction mixtures (1:2, 1:5, 2:1 and 5:1). Therefore, the concentrations of acid and alcohol increased from 0.1 to 0.2 and 0.5 M. The effect of biocatalyst loading was evaluated by incubating 0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 wt.% lyophilized *Sc*-WCL for 3 h at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm, in a reaction medium (molar ratio 1:1) containing 1 g of 3 \AA molecular sieves. After time reaction, 2 mL-samples were withdrawn from the reaction mixtures, centrifuged ($12,857 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min), and the residual alcohol content in the supernatants was determined by gas chromatography analysis.

The time-conversion profile was investigated in a standard esterification reaction (described above) using 0.5 wt.% *Sc*-WCL. Samples (2 mL) were withdrawn from the reaction mixture periodically and centrifuged at $12,857 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min to remove the biocatalyst. The progress of the synthesis was monitored by the butanol consumption in the supernatants by gas chromatography analysis.

Sc-WCL was evaluated in repeated batches under the conditions of maximum conversion (molar ratio butyric acid: butanol 1:1, *Sc*-WCL loading 0.5 wt.%, and 3 h time reaction). Successive reuses were performed at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 250 rpm, in 25 mL closed amber glass flask with plastic seal using heptane as solvent in a reaction volume of 10 mL containing 1 g of 3 \AA molecular sieves. After each batch, *Sc*-WCL was recovered by centrifugation and washed with 10 mL of heptane in order to remove adsorbed compounds on the biocatalyst surface. Then, *Sc*-WCL was used in a new ester synthesis.

5.2.6 GC analysis

The butanol consumption was measured by gas chromatography in an Agilent 7890A GC System equipped with a HPInnowax column (30 m x 0.320 mm; 0.25 μ m) and a flame ionisation detector. Nitrogen was used as a carrier gas. The column temperature was gradually increased from 100 °C (2 min) to 200 °C (temp. rate 30 °C/min plus 1 min at 200 °C). Injection ports and detector temperatures were maintained both at 250 °C. The butanol concentration was calculated from the butanol peak area using a standard curve (Apêndice 1).

The conversion of butanol to butyl butyrate was estimated from the concentration of butanol consumed in the reaction mixture, using Eq. (1):

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

where C_0 and C represent the concentration of butanol at the beginning and end of the reaction, respectively.

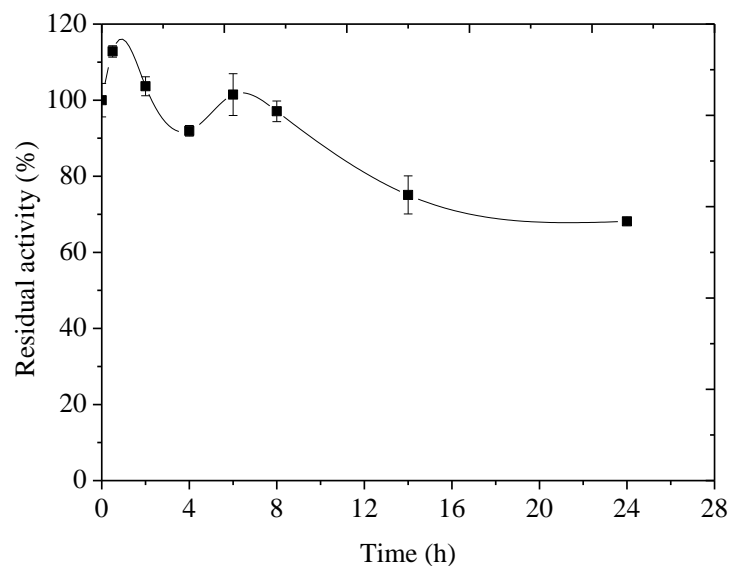
5.3 Results and discussion

5.3.1 Effect of solvents on *Sc*-WCL activity

The *Sc*-WCL showed high tolerance in butanol and heptane, as can be seen in Figure 5.1. Residual activity remained around 100% even after 8 h incubation in organic medium. Ayaz et al. (2015) also reported stability towards organic solvents of lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7, which remained 50% active in the presence of 50% (v/v) n-butanol for 1 h at 30 °C. The higher stability of *Sc*-WCL can be due the lipase be associated to the cells, where the cellular environment protected the enzyme against deactivating effects (SCHÜÜRMAN et al., 2014).

The high stability of *Sc*-WCL towards mixture of butanol and heptane is an important feature for organic syntheses, as the butyl butyrate synthesis, chosen as a model in this work.

Figure 5.1: Stability of *Sc*-WCL towards 0.1 M butanol in heptane at 37 °C and 200 rpm. Initial enzyme concentration of 27.3 TBU/g *Sc*-WCL was taken as 100%. Results are shown as means of triplicate \pm s.d.



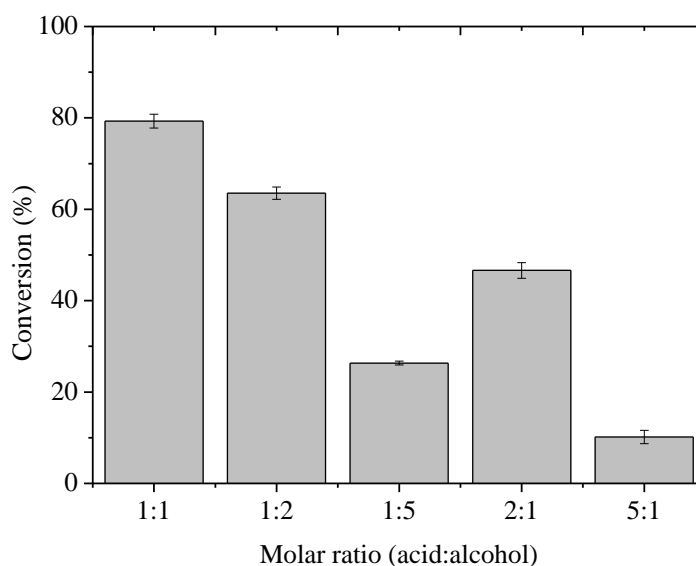
5.3.2 Synthesis of butyl butyrate catalyzed by *Sc*-WCL

Effect of acid/alcohol molar ratio

Figure 5.2 shows that stoichiometric ratio of butyric acid/butanol yielded the highest conversion in the synthesis of butyl butyrate catalyzed by *Sc*-WCL. On the other hand, excess of acid and alcohol decreased the reaction conversion. Similar behaviour was reported in the synthesis of butyl butyrate catalyzed by lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene (MCI-TLL) (MARTINS et al., 2013).

Excess of acid may have inactivated the enzyme, since lipase from *S. clavuligerus* is an alkaline lipase (Capítulo 4 - Figure 4.7). Similarly, excess of butanol could exhibit some deleterious effect on the 3D structure of the lipase.

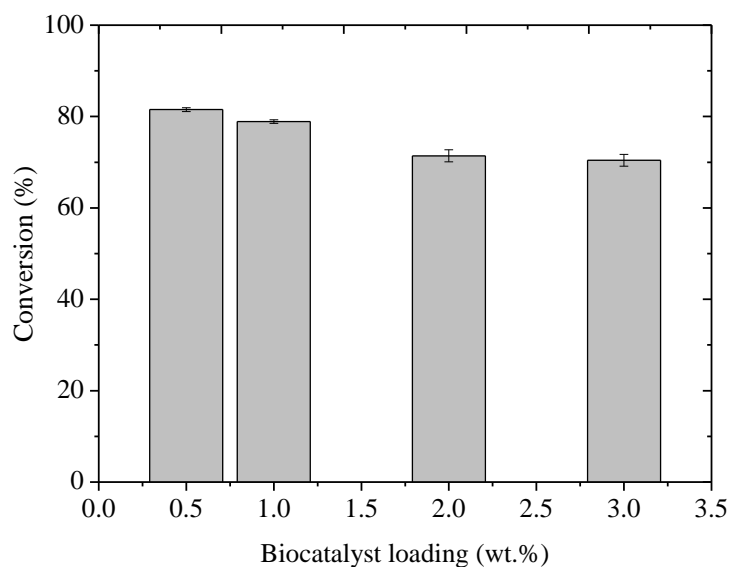
Figure 5.2: Effect of butyric acid/butanol molar ratio in the conversion of butyl butyrate synthesis. Reaction conditions: 6 h at 37 °C and 250 rpm stirring, 1.0 wt.% of *Sc*-WCL, heptane as diluent, and 1 g of molecular sieve. Results are expressed as means of triplicate \pm s.d.



Effect of biocatalyst loading

Figure 5.3 shows that the lowest amount of biocatalyst (0.5 wt.%) yielded the highest conversion in the synthesis of butyl butyrate (around 80%), while an increase in the biocatalyst loading caused a decrease in the ester conversion. This may be due to mass transfer limitation by the high density of cells in the reaction medium, impairing the diffusion of substrates closer to the *Sc*-WCL. Similar behaviour was reported to the synthesis of butyl butyrate catalyzed by *Thermomyces lavuginosus* lipase immobilized on eggshells (SALLEH et al., 2016).

Figure 5.3: Effect of biocatalyst loading on ester yield. Reaction mixtures (substrate molar ratio 1:1) containing 1 g of molecular sieve were incubated with *Sc*-WCL for 3 h at 37 °C and 250 rpm. Results are expressed as means of triplicate \pm s.d.



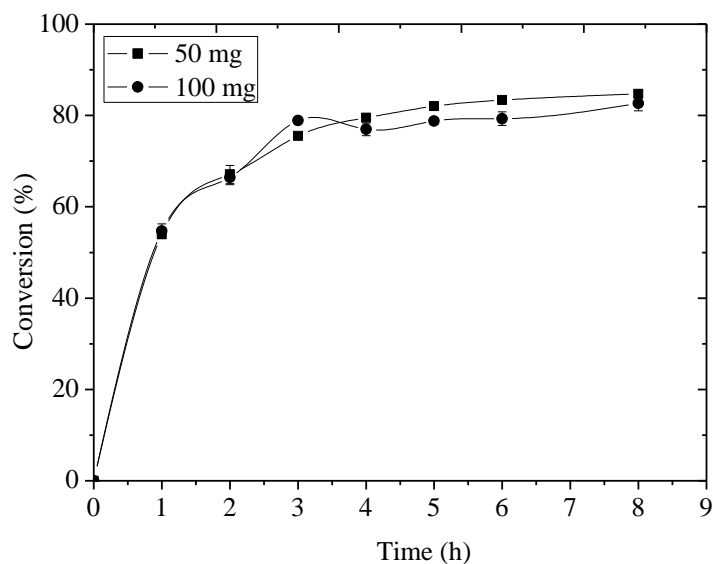
Progress of butyl butyrate synthesis

Enzyme loading is an important parameter from the industrial point of view since it directly affects the process cost. The study of the biocatalyst loading showed that the ester conversion after 3 h was similar for 0.5 and 1.0 wt.% *Sc*-WCL. Thus, the progress of the butyl butyrate synthesis over time was monitored for the two loads in order to determine the maximum conversion of the synthesis of butyl butyrate

Figure 5.4 shows that the ester conversion profiles were similar for both biocatalyst amounts. Ester conversion achieved around 80% using 0.5 and 1.0 wt.% *Sc*-WCL in 3 h reaction. After that, the conversion increased slowly, achieving 85% in 8 h reaction. Despite of different reactional conditions (temperature, organic solvent, and enzyme load), conversions in the range of 60-95% have been reported for the enzymatic synthesis of butyl butyrate (KOPP et al., 2015 ; MARTINS et al., 2013; MENDES et al., 2012).

Therefore, enzyme load and reactional time were established as 0.5 wt.% and 3 h, respectively, for further studies because these conditions contribute to higher butyl butyrate specific productivity (MENDES et a., 2012).

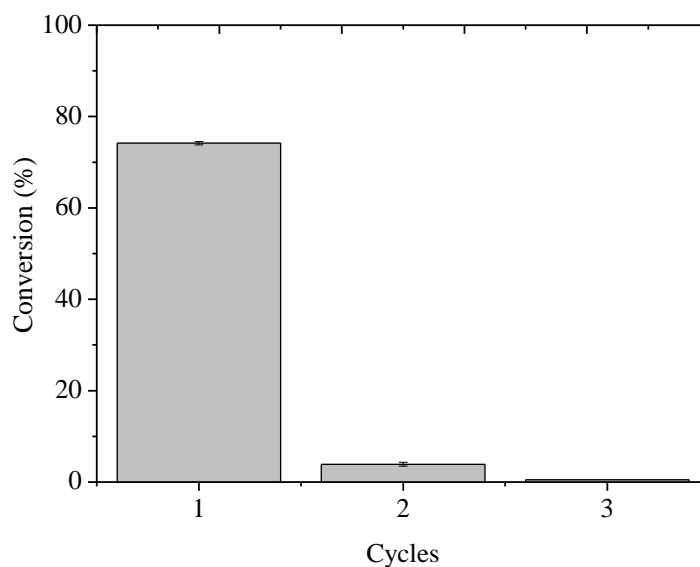
Figure 5.4: Profiles of conversion over time in the synthesis of butyl butyrate. Reaction conditions: molar ratio 1:1 (butyric acid:butanol in heptane), 37 °C, 250 rpm, 1 g of molecular sieve, with (■) 0.5 wt.% and (●) 1.0 wt.% *Sc*-WCL.



Reuse of Sc-WCL in repeated batches

As can be seen in Figure 5.5, *Sc*-WCL showed very low stability with respect to recyclability. The ester conversion dropped to below 5% already in the second reactional cycle. This loss in catalyst performance may be associated to the cell fragility with respect to shear (LARGE et al., 1998). The cell disruption due to mechanical stirring may release the lipase, which is lost in the centrifugation and washing steps. However, compared to the commercial lipases (immobilized on solid supports or isolated soluble) *Sc*-WCL is a biocatalyst with lower cost because it is obtained directly from fermentation medium by simple centrifugation, washing and freeze-drying steps. Even being used only once, the use of *Sc*-WCL as biocatalyst is advantageous from an economic point of view in the synthesis of butyl butyrate.

Figure 5.5: Operational stability of *Sc*-WCL in the synthesis of butyl butyrate. Reaction conditions: 0.5 wt.% *Sc*-WCL, butyric acid/butanol molar ratio 1:1, 37 °C, 250 rpm, 1 g of molecular sieve, cycle time 3 h.



5.4 Conclusion

Sc-WCL showed to be a low-cost alternative biocatalyst in the synthesis of butyl butyrate. Its high stability towards organic media allowed the esterification reaction to achieve around 80% of conversion after a short period of time (3 h) and low temperature (37 °C). Although it was not possible to recycle the catalyst, as the expensive soluble commercial enzymes, WCL could be discarded every batch. However, some strategies could improve its operational stability, such as entrapment in a polymer (calcium alginate, for example), which could prevent loss of enzyme by shear.

5.5 Acknowledgements

The authors thank the financial support provided by the Brazilian Foundations CNPq (grant #142128/2012-0) and CAPES. The authors also thank Prof. Alberto Colli Badino Junior (DEQ/UFSCar, São Carlos, Brazil) for *Streptomyces clavuligerus* strain ATCC 27064 donation.

5.6 References

ABBAS, H. & COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 32, n. 5, p. 589-595, 2003.

ADACHI, D.; KOH, F.; HAMA, S.; OGINO, C.; KONDO, A. A robust whole-cell biocatalyst that introduces a thermo- and solvent-tolerant lipase into *Aspergillus oryzae* cells: Characterization and application to enzymatic biodiesel production. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 52, p. 331–335, 2013.

AYAZ, B.; UGUR, A.; BORAN, R. Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. OC119-7 for biodiesel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 4, p. 103–108, 2015.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, p. 133-153, 2000.

BRAULT, G.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; LÉPINE, F.; DOUCET, N. Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. **PLoS ONE**, vol. 9, n. 3, e91872, 2014.

CALVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R.; DE FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, vol. 26, p. 319-329, 2015.

HLAVSOVA, K.; ZAREVUCKA, M.; WIMMER, Z.; MACKOVA, M.; SOVOVA, H. *Geotrichum candidum* 4013: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 61, p.188–193, 2009.

KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering B**, vol. 193, p. 217–228, 2015.

LARGE, K. P.; ISON, A. P.; WILLIAMS, D. J. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Biotechnology**, vol. 63, p. 111–119, 1998.

LORENZONI, A. S. G.; GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 27, n. 2, p. 196–200, 2012.

MARANESI, G. L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 21, p. 509-514, 2005.

MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. R. L.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALÁN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, vol. 134, p. 417-422, 2013.

MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using

Thermomyces lanuginosus lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 127, p. 67-75, 2016.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive & Functional Polymers**, vol. 73, p. 160–167, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, p. 1071-1077, 2007.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, vol. 2011, p. 1-16, 2011.

SALLEH, S.; SEE, Y. S.; SERRI, N. A.; HENA, S.; TAJARUDIN, H. A. Synthesis of butyl butyrate in 93 % yield by *Thermomyces lanuginosus* lipase on waste eggshells. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 14, p. 189–194, 2016.

SANTOS, J. C. E DE CASTRO, H. F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 22, p. 1007–1011, 2006.

SCHÜÜRMAN, J.; QUEHL, P.; FESTEL, G.; JOSE, J. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 98, p. 8031–8046, 2014.

SHU, Z. Y.; WU, J. G.; CHENG, L. X.; CHEN, D.; JIANG, Y. M.; LI, X.; HUANG, J. Z. Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 166, p. 536–548, 2012.

SOLARTE, C.; YARA-VARÓN, E.; ERAS, J.; TORRES, M.; BALCELLS, M.; CANELAGARAYOA, R. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.

TALUKDER, M. M. R.; LEE, H. Z. S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L. C.; WARZECHA, D.; WU, J. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 89, p. 108-113, 2013.

WANG, D.; XU, Y.; TENG, Y. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 30, p. 147– 155, 2007.

YADAV, G. D.; RAHUMAN, M. S. M. M. Cation-exchange resin-catalysed acylations and esterifications in fine chemical and perfumery industries. **Organic Process Research and Development**, vol. 6, n. 5, p. 706-713, 2002.

Capítulo 6 – Conclusões e Sugestões

6.1 Conclusões finais

O protocolo utilizado inicialmente para a produção de lipase pela linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus* foi baseado naquele aplicado para a produção de ácido clavulânico pelo mesmo microrganismo. O principal intuito dos estudos preliminares era de avaliar se as etapas do protocolo original eram, de fato, essenciais para a produção de lipase. Concluiu-se que a etapa de inóculo com duração de 24 h, além de importante para a produção do metabólito secundário, também favoreceu a produção de lipase. A recuperação da lipase associada à célula, a fim de se avaliar o potencial de *Streptomyces clavuligerus* na produção de lipases intra e extracelulares, foi realizada por rompimento das células por sonicação. O tempo de rompimento que resultou na maior liberação de lipase foi de 15 min.

Os estudos de localização da lipase de *Streptomyces clavuligerus* mostraram que a enzima é predominantemente associada à célula, motivando a utilização das células inteiras como biocatalisador (lipase “whole-cell”).

As condições de cultivo de *Streptomyces clavuligerus* em câmara incubadora rotativa que resultaram em maior atividade hidrolítica (3.000 U.L^{-1}) de lipase “whole-cell” foram: frasco Erlenmeyer aletado, ausência de glicerol no meio de produção, pH 6,8 e $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Essas condições foram então utilizadas no estudo para a determinação dos parâmetros operacionais do biorreator para produção da lipase “whole-cell”. Os parâmetros operacionais em reator de bancada que resultaram em maior produtividade volumétrica de lipase “whole-cell” ($54 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foram: agitação de 400 rpm e aeração de 1 vvm. O estudo da influência da agitação e aeração indicou que apenas a agitação tem efeito estatisticamente significativo na produtividade do biocatalisador. Ainda dos estudos envolvendo a melhoria das condições de cultivo de *S. clavuligerus* para a produção de lipase “whole-cell”, concluiu-se que, usando meio de produção sem glicerol, a máxima produtividade volumétrica em biorreator foi alcançada após 24 h de cultivo ($52.5 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), enquanto que produtividade similar em câmara rotativa foi obtida somente após 48 h de cultivo ($54.8 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

O potencial catalítico da lipase “whole-cell” de *Streptomyces clavuligerus* (*Sc-WCL*) em reações de hidrólise foi comparável ao de preparações comerciais de lipase, o que é significativo por se tratar de um biocatalisador “whole-cell” produzido sem a necessidade de

etapas dispendiosas de recuperação e purificação. A *Sc*-WCL foi mais ativa a 60 °C e pH 10,7, e mais estável na faixa de 30 a 40 °C após 1 h de incubação a pH 10. Além disso, o biocatalisador apresentou potencial catalítico em reações de esterificação.

Para a síntese de butirato de butila, um éster de aroma de importância industrial, catalisada pela *Sc*-WCL, as condições reacionais que resultaram em maior conversão (85%) foram: 0,5 wt.% de catalisador, razão molar ácido butírico/butanol 1:1 e 8 h de reação. O biocatalisador não foi estável operacionalmente em ensaios de reuso, perdendo praticamente todo o potencial catalítico já na segunda batelada. Apesar da impossibilidade de reuso do biocatalisador em bateladas repetidas, *Sc*-WCL mostrou-se potencialmente atraente em biotransformação em meio orgânico, já que é obtido a baixo custo e apresentou alta tolerância a heptano e butanol.

6.2 Sugestões para trabalhos futuros

No desenvolvimento deste trabalho, uma série de questões relacionadas ao tema foi levantada. Assim, criou-se a possibilidade de uma investigação mais aprofundada e de novas frentes de pesquisa, que são apresentadas como sugestões de trabalhos futuros.

Neste trabalho, atividade hidrolítica de lipase de *S. clavuligerus* foi detectada em amostras de sobrenadante após centrifugação do caldo fermentado (extracelular) e de células intactas. Trabalhos futuros poderiam investigar se as lipases detectadas extra e intracelularmente possuem propriedades bioquímicas e características estruturais diferentes, tais como massa molecular, presença de “tampa” hidrofóbica, pH e temperatura de maior atividade hidrolítica, especificidade ao substrato.

Para uma caracterização mais completa da lipase “whole-cell” de *Streptomyces*, sugere-se estudar o efeito de sais e surfactantes na atividade hidrolítica do biocatalisador bem como sua estabilidade ao pH e a solventes orgânicos e álcoois, além dos já avaliados neste trabalho. Além disso, propõe-se investigar se a lipase “whole-cell” de *Streptomyces* catalisa reações de transesterificação.

No que diz respeito à produção da lipase “whole-cell” em biorreator, a realização de experimentos complementares variando a agitação e aeração do meio de cultivo resultaria na otimização dessas condições operacionais.

Biocatalisadores “whole-cell” necessitam que substrato e produto sejam capazes de se difundirem através da membrana celular. Há relatos na literatura de que a composição de ácidos graxos na membrana celular afeta sua permeabilidade. A presença de ácido graxos insaturados no meio pode promover maior permeabilidade ao passo que ácidos graxos saturados podem conferir rigidez à membrana. A lipase “whole-cell” de *S. clavuligerus* apresentou baixa estabilidade operacional, impossibilitando seu reuso na síntese de butirato de butila. Pesquisas futuras poderiam avaliar o efeito da adição de ácidos graxos saturados e insaturados na permeabilidade e rigidez da membrana celular de *Streptomyces*, uma vez que a rigidez na membrana poderia resultar em maior estabilidade do biocatalisador. Além disso, ensaios de imobilização das células de *S. clavuligerus* em diferentes suportes (hidrofóbico, hidrofílico e híbrido) ou por encapsulamento em polímeros (como o alginato de cálcio) poderiam ser realizados para avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador na síntese do butirato de butila em diferentes ciclos usando reatores em batelada e de escoamento contínuo.

Com relação à aplicação da lipase “whole-cell” de *Streptomyces* na síntese de butirato de butila, trabalhos futuros poderiam avaliar outras condições reacionais tais como: temperatura, quantidade/tipo de agente dessecante, presença de água no meio reacional. Sugere-se ainda avaliar o biocatalisador na síntese de outros ésteres de ácidos graxos, como por exemplo, o oleato de butila, que tem sido atualmente utilizado como aditivo em lubrificantes.

Referências bibliográficas

ABDEL-FATTAH, Y. R. Optimization of thermostable lipase production from a thermophilic *Geobacillus sp.* using Box-Behnken experimental design. **Biotechnology Letters**, vol. 24, p. 1217–1222, 2002.

AÇIKEL, U.; ERSAN, M.; AÇIKEL, Y. S. The effects of the composition of growth medium and fermentation conditions on the production of lipase by *R. delemar*. **Turkish Journal of Biology**, vol. 35, p. 35-44, 2011.

ALY, M. M.; TORK, S.; AL-GARNI, S. M.; NAWAR, L. Production of lipase from genetically improved *Streptomyces exfoliates* LP10 isolated from oil-contaminated soil. **African Journal of Microbiology Research**, vol. 6, n. 6, p. 1125-1137, 2012.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, p. 6475-6490, 2013.

AYAZ, B.; UGUR, A.; BORAN, R. Purification and characterization of organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces sp.* OC119-7 for biodiesel production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 4, p. 103–108, 2015.

BAN, K.; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Whole-cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cell immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 8, p. 39-43, 2001.

BASCARÁN, V.; HARDISSON, C.; BRAÑA, A. F. Regulation of extracellular protease production in *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 34, p. 208-213, 1990.

BERK, P. D. How do long chain free fatty acids cross cell membranes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, vol. 212, p. 1–4, 1996.

BONDIOLI, P. The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions. **Topics in Catalysis**, vol. 27, n. 1, p. 77-82, 2004.

BORA, L.; GOHAIN, D.; DAS, R. Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 88, p. 1959–1970, 2013.

BOSE, A.; KEHARIA, H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 2, p. 255-266, 2013.

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, vol. 343, p. 767-770, 1990.

BRAULT, G.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; LÉPINE, F.; DOUCET, N. Short-chain flavor ester synthesis in organic media by an *E. coli* whole-cell biocatalyst expressing a newly characterized heterologous lipase. **PLoS ONE**, vol. 9, n. 3, e91872, 2014.

BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, G. G.; LAWSON, D. M., et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, vol. 351, p. 491–494, 1991.

BUSSAMARA, R.; FUENTEFRIA, A. M.; DE OLIVEIRA, E. S.; BROETTO, L.; SIMCIKOVA, M.; et al. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 268–275, 2010.

CADIRCI, B. H.; YASA, I.; KOCYIGIT, A. *Streptomyces* sp. TEM 33 possess high lipolytic activity in Solid State Fermentation in comparison with Submerged Fermentation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 46, n. 1, p. 23–29, 2016.

CALVALCANTE, P. M. M.; DA SILVA, R. L.; DE FREITAS, J. J. R.; DE FREITAS, J. C. R.; DE FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, vol. 26, p. 319–329, 2015.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformações. **Química Nova**, vol. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

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

CHO, S. S.; PARK, D. J.; SIMKHADA, J. R.; HONG, J. H.; SOHNG, J. K.; LEE, O. H.; YOO, J. C. A neutral lipase applicable in biodiesel production from a newly isolated *Streptomyces* sp. CS326. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 35, p. 227–234, 2012.

CHOI, D. B.; TAMURA, S.; PARK, Y. S.; OKABE, M.; SERIU, Y.; TAKEDA, S. Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 82, n. 2, p. 183–186, 1996.

CHRISTENSEN, M. W.; ANDERSEN, L.; KIRK, O.; HOLM, H. C. Industrial lipase immobilization. **European Journal of Lipid Science and Technology**, vol. 105, p. 318–321, 2003.

COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, vol. 101, p. 8308–8314, 2010.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 26, p. 657–663, 2000.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, vol. 97, p. 1828–1833, 2006.

De CARVALHO, C. C. C. R. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. **Biotechnology Advances**, vol. 29, p. 75-83, 2011.

De CARVALHO, C. C. C. R.; Da FONSECA, M. M. R. Principal component analysis applied to bacterial cell behaviour in the presence of organic solvents. **Biocatalysis and Biotransformation**, vol. 22, p. 203-204, 2004.

De CARVALHO, C. C. C. R.; Da FONSECA, M. M. R. Bacterial whole cell biotransformations: *in vivo* reactions under *in vitro* conditions. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, vol. 1, p. 32-39, 2007.

De CARVALHO, C. C. C. R.; FATAL, V.; ALVES, S. S.; Da FONSECA, M. M. R. Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to high concentrations of toluene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 76, p. 1423-1430, 2007.

DEIVE, F. J.; CARVALHO, E.; PASTRANA, L.; RUA, M. L.; LONGO, M. A.; et al. Strategies for improving extracellular lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27. *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 3630–3637, 2009.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Molecular Biotechnology**, vol. 38, p. 41–45, 2008.

DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M. A.; RÚA, M. L.; SANROMAN, M. A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 26, n. 2-3, p. 95-99, 2005.

DORAN, J. L.; LESKIW, B. K.; AIPPERSBACH, S.; JENSEN, S. E. Isolation and characterization of a 3-lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. **Journal of Bacteriology**, vol. 172, n. 9, p. 4909-4918, 1990.

ELPINER, I. E.; SOKOLSKAYA, A. V. & MARGULIS, M. A. Initiation of chain reaction under an ultrasonic wave effect. **Nature**, vol. 208, p. 945-946, 1965.

FAYOLLE, F.; MARCHAL, R.; MONOT, F.; BLANCHET, D.; BALLERINI, D. An example of production of natural esters: Synthesis of butyl butyrate from wheat flour. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 13, p. 215-220, 1991.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERRATO, F., CARRIERE, F., SARDA, L., VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in Enzymology**, vol. 286, p. 327–347, 1997.

FERREIRA, W. **Emprego de enzimas na produção de ésteres para cosméticos**, 2016. Disponível em: <<https://www.linkedin.com/pulse/emprego-de-enzimas-na-produção-ésteres-para-willer-ferreira>>. Acesso em: julho 2016.

FICKERS, P.; DESTAIN, J.; THONART, P. Improvement of *Yarrowia lipolytica* lipase production by fed-batch fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, vol. 49, p. 212–215, 2009.

FOTOUH, D. M. A.; BAYOUMI, R. A.; HASSAN, M. A. Production of thermoalkaliphilic lipase from *Geobacillus thermoleovorans* DA2 and application in leather industry. **Enzyme Research**, vol. 2016, p. 1-9, 2016.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. In: **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**, vol. 1. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 369–385.

FUKUDA, H.; HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; NODA, H. Whole-cell biocatalysts for biodiesel fuel production. **Trends in Biotechnology**, vol. 26, n. 12, p. 668–673, 2008.

GANI, S. S. A.; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A.; KASSIM, A.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; ISMAIL, Z. Engkabang fat esters for cosmeceutical formulation. **Journal of Surfactants and Detergents**, vol. 14, p. 227–233, 2011.

GARCIA-GALAN, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, vol. 353, n.16, p. 2885–2904, 2011.

GARLAPATI, V. K.; VUNDAVILLI, P. R.; BANERJEE, R. Evaluation of lipase production by genetic algorithm and particle swarm optimization and their comparative study. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 162, n. 5, p. 1350–1361, 2010.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, vol. 23, p. 471-499, 2005.

GUPTA R.; GUPTA N.; RATHI P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 64, p. 763–781, 2004.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, vol. 57, p. 40-54, 2015.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus *Penicillium simplicissimum* by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, vol. 100, p. 5249–5254, 2009.

HAM, H. J.; RHO, H. J.; SHIN, S. K.; YOON, H. J. The TGL2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an active acylglycerol lipase located in the mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 285, p. 3005–3013, 2010.

HAMA, S.; YAMAGI, H.; KAIEDA, M.; ODA, M.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of fatty acid membrane composition on whole-cell biocatalysts for biodiesel-fuel production. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 21, p. 155-160, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HEIPIEPER, H. J.; NEUMANN, G.; CORNELISSEN, S.; MEINHARDT, F. Solvent-tolerant bacteria for biotransformations in two-phase fermentations systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 74, p. 961-973, 2007.

HIGGENS, C. E.; KASTNER, R. E. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a β -Lactam antibiotic producer. **International Journal of Systematic Bacteriology**, vol. 21, n. 4, p. 326-331, 1971.

HLAVSOVA, K.; ZAREVUCKA, M.; WIMMER, Z.; MACKOVA, M.; SOVOVA, H. *Geotrichum candidum* 4013: Extracellular lipase versus cell-bound lipase from the single strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 61, p.188–193, 2009.

INDUMATHI, R.; RAJ, S. P. Biodiesel production from microbial whole cell biocatalyst. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, vol. 3, n. 8, p. 94-101, 2013.

JERMSUNTIEA, W.; AKI, T.; TOYOURA, R.; IWASHITA, K.; KAWAMOTO, S.; et al. Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. **New Biotechnology**, vol. 28, p. 158–164, 2011.

JOHANNES, T.; SIMURDIK, M. R.; ZHAO, H. Biocatalysis. In: LEE, S. **Encyclopedia of Chemical Processing**. Taylor & Francis, 2006. p. 101-110.

KANASAWUD, P.; PHUTRAKUL, S.; BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Triglyceride interesterification by lipases. 3. Alcoholysis of pure triglycerides. **Enzyme Microbial Technology**, vol. 14, p. 959-965, 1992.

KIM, H. S.; PARK, Y. I. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 17, n. 10, p. 1638–1644, 2007.

KOPP, W.; SILVA, F. A.; LIMA, L. N.; MASUNAGA, S. H.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; ARAÚJO-MOREIRA, F. M.; GIORDANO, R. L. C. Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering B**, vol. 193, p. 217–228, 2015.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. D. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-Ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, vol. 15, p. 4836-4841, 1991.

KUMAR, V.; SINGH, D.; SANGWAN, P.; GILL, P. K. Global Market Scenario of Industrial Enzymes. In: VIKAS BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. **Industrial Enzymes: Trends, Scope and Relevance**. New York: Nova Science Publishers, 2014. p. 173-196.

LARGE, K. P.; ISON, A. P.; WILLIAMS, D. J. The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Biotechnology**, vol. 63, p. 111–119, 1998.

LARGE, K. P.; MIRJALILI, N.; OSBORNE, M.; PEACOCK, L. M.; ZORMPAIDIS, V.; WALSH, M.; CAVANAGH, M. E.; LEADLAY, P. F.; ISON, A.P. Lipase activity in *Streptomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 569–575, 1999.

- LEE, P. C. E HO, C. C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* in palm-oil medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 12, p. 73–75, 1996.
- LIMA, L. N.; OLIVEIRA, G. C.; ROJAS, M. J.; CASTRO, H. F.; DA RÓS, P. C. M.; MENDES, A. A.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLI, P. W. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, vol. 42, p. 523–535, 2015.
- LOPEZ, P. & BURGOS, J. Lipoxygenase inactivation by manothermosonication: effects of sonication on physical parameters, pH, KCl, sugars, glycerol, and enzyme concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 43, n. 3, p. 620-625, 1995.
- LORENZONI, A. S. G.; GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z; RODRIGUES, R. C. Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 27, n. 2, p. 196–200, 2012.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, vol. 3, p. 193-217, 1985.
- MACRIS, J. B.; KOURENTZI, E.; HATZINKOLAOU, D. G. Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, vol. 31, n. 8, p. 807-812, 1996.
- MALA, J. G. S.; EDWINOLIVER, N. G.; KAMINI, N. R.; PUVANAKRISHNAN, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **The Journal of General and Applied Microbiology**, vol. 53, n. 4, p. 247–253, 2007.
- MARANESI, G. L.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 21, p. 509-514, 2005.
- MARKETSANDMARKETS.COM. **Lipase Market by Source (Microbial Lipases, Animal Lipases), Application (Animal Feed, Dairy, Bakery, Confectionery, Others), & by Geography (North America, Europe, Asia-Pacific, Latin America, RoW) - Global Forecast to 2020**, 2015. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/lipase-market-205981206.html>>. Acesso em: junho 2016.
- MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. R. L.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALÁN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, vol. 134, p. 417-422, 2013.
- MATTE, C. R.; BORDINHÃO, C.; POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 127, p. 67-75, 2016.

MEIRELLES, F. V. P. Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ50682), **Ph.D. thesis**, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 1997.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C. Preparation and application of epoxy–chitosan/alginate support in the immobilization of microbial lipases by covalent attachment. **Reactive & Functional Polymers**, vol. 73, p. 160–167, 2013.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 78, p. 119-134, 2012.

MISHRA, S.; GUPTA, N. Inducers for the enhanced production of lipase by *Streptomyces* isolated from mangrove ecosystem. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, vol. 3, n. 11, p. 370-376, 2014.

MONTESINOS, J. L.; DALMAU, E.; CASAS, C. Lipase production in continuous culture of *Candida rugosa*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 78, 753–761, 2003.

MOREIRA, K. A.; CAVALCANTI, M. T. H.; DUARTE, H. S.; TAMBOURGI, E. B.; MELO, E. H. M.; SILVA, V. L.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 32, p. 215-220, 2001.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, vol. 7, n. 2, p. 57-66, 2002.

NAGARAJAN, S. New Tools for Exploring “Old Friends—Microbial Lipases”. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 168, p. 1163–1196, 2012.

NAJJAR, A.; ROBERT, S.; GUERIN, C.; VIOLET-ASTHER, M.; CARRIERE, F. Quantitative study of lipase secretion, extracellular lipolysis, and lipid storage in the yeast *Yarrowia lipolytica* grown in the presence of olive oil: analogies with lipolysis in humans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 89, p. 1947–1962, 2011.

OLLIS, D. L., CHEAH, E., CYGLER, M., DIJKSTRA, B., FROLOW, F., et al. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering**, vol. 5, p. 197–211, 1992.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, p. 1071-1077, 2007.

PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Enzymatic resolution of (±)-trans-4-(4'-fluorophenyl)-6-oxo-piperidin-3-ethyl carboxylate, an intermediate in the synthesis of (–)-Paroxetine. **Tetrahedron: Asymmetry**, vol. 13, p. 2375–2381, 2002.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, vol. 29, p. 93-99, 2006.

- PARK, Y. S.; MOMASE, I.; TSUNODA, K.; OKABE, M. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 40, p. 773–779, 1994.
- PATNAIK, R.; LOUIE, S.; GAVRILOVIC, V.; PERRY, K.; STEMMER, W.P.; RYAN, C.M.; DEL CARDAYRE, S. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance. **Nature Biotechnology**, vol. 20, n. 7, p. 707–712, 2002.
- QIN, H. E.; YAN, X. U.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, vol. 29, n.1, p. 41-46, 2008.
- RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 52, n. 1, p. 207-219, 2009.
- RAHMAN, N. F. A; BASRI, M.; RAHMAN, M. B. A; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B. High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**, vol. 102, p. 2168–2176, 2011.
- RAMOS, E. Z.; MIOTTI JÚNIOR, R. H.; CASTRO, P. F.; TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDÉZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 118, p. 43–51, 2015.
- REIS, P.; HOLMBERG, K., WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, vol. 147-148, p. 237-250, 2009.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, vol. 2011, p. 1-16, 2011.
- ROMO-SANCHEZ, S.; ALVES-BAFFI, M.; ARÉVALO-VILLENA, M.; ÚBEDA-IRANZO, J.; BRIONES-PÉREZ, A. Yeast biodiversity from oleic ecosystems: Study of their biotechnological properties. **Food Microbiology**, vol. 27, p. 487-492, 2010.
- RUSSEL, N. J.; EVANS, R. I.; TER STEEG, P. F.; HELLEMONS, J.; VERHEUL, A.; ABEE, T. Membranes as a target for stress adaptation. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 28, p. 255-261, 1995.
- SALLEH, S.; SEE, Y. S.; SERRI, N. A.; HENA, S.; TAJARUDIN, H. A. Synthesis of butyl butyrate in 93 % yield by *Thermomyces lanuginosus* lipase on waste eggshells. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 14, p. 189–194, 2016.
- SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B. et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**, vol. 45, n. 8, p. 1348–1354, 2010.
- SANTOS, K. C.; CASSIMIRO, D. M. J.; AVELAR, M. H. M.; HIRATA, D. B.; CASTRO, H. F.; ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, vol. 49, p. 462–470, 2013.

- SANTOS, J. C. E DE CASTRO, H. F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 22, p. 1007–1011, 2006.
- SCHÜÜRMAN, J.; QUEHL, P.; FESTEL, G.; JOSE, J. Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 98, p. 8031–8046, 2014.
- SHARMA, C. K.; KANWAR, S. S. Purification of a novel thermophilic lipase from *B. licheniformis* MTCC-10498. **ISCA Journal of Biological Sciences**, vol. 1, n. 3, p. 43-48, 2012.
- SHOW, P. L.; TAN, C. P.; SHAMSUL ANUAR, M.; ARIFF, A.; YUSOF, Y. A.; et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology**, vol. 116, p. 226–233, 2012.
- SHU, Z. Y.; WU, J. G.; CHENG, L. X.; CHEN, D.; JIANG, Y. M.; LI, X.; HUANG, J. Z. Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 166, p. 536–548, 2012.
- SILVEIRA, E. A.; TARDIOLI, P.W.; FARINAS, C.S. Valorization of palm oil industrial waste as feedstock for lipase production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 179, n. 4, p. 558-571, 2016.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 166, p. 486-520, 2012.
- SINGH, M.; SAURAV, K.; SRIVASTAVA, N.; KANNABIRAN, K. Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrates. **Current Research Journal of Biological Sciences**, vol. 2, n. 4, p. 241–245, 2010.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 79, n. 1-3, p. 745-758, 1999.
- SOLARTE, C.; YARA-VARÓN, E.; ERAS, J.; TORRES, M.; BALCELLS, M.; CANELAGARAYOA, R. Lipase activity and enantioselectivity of whole cells from a wild-type *Aspergillus flavus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 78-83, 2014.
- SOO, K. H.; PARK, Y. I. Lipase activity and tacrolimus production in *Streptomyces clavuligerus* CKD 1119 mutant strains. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, vol. 17, n. 10, p. 1638–1644, 2007.
- SOOD, S.; SINGHAL, R.; BHAT, S.; KUMAR, A. Inoculum Preparation. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition). Massachusetts: Academic Press, 2011. p. 151-164. (Volume 2: Engineering Fundamentals of Biotechnology).
- SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1543, p. 223–238, 2000.

TALUKDER, M. M. R.; LEE, H. Z. S.; LOW, R. F.; PEI-LYN, L. C.; WARZECHA, D.; WU, J. Potential use of whole cell lipase from a newly isolated *Aspergillus nomius* for methanolysis of palm oil to biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 89, p. 108-113, 2013.

TEODORO, J. C. **Influência das condições de alimentação de glicerol e ornitina na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus***. 2008. 129 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008.

THAKUR, B. R. & NELSON, P. E. Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. **Die Nahrung**, vol. 41, p. 299-301, 1997.

THAKUR S. Lipases, its sources, properties and applications: A review. **International Journal of Scientific and Engineering Research**, vol. 3, n. 7, p. 1-29, 2012.

UHLIG, H. Industrial enzymes and their applications, **John Wiley & Sons**, New York, NY, USA, 1998.

VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. Biodiesel production technology. **Golden, USA**: National Renewable Energy Laboratory, 2004, 105 p. (NREL/SR-510-36244).

WANDREY, C.; LIESE, A.; KIHUMBU, D. Industrial biocatalysis: past, present, and future. **Organic Process Research & Development**, vol. 4, n. 4, p. 286–290, 2000.

WANG, D.; XU, Y.; TENG, Y. Synthetic activity enhancement of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* by pretreatment with isooctane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 30, p. 147– 155, 2007.

WEI, L.; WEI, D.; DEHUA, L. Optimization of whole-cell catalyze methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 45, p. 122-127, 2007.

WOLSKI, E.; MENUSSI, E.; MAZUTTI, M. et al. Response surface methodology for optimization of lipase production by an immobilized newly isolated *Penicillium* sp. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, vol. 47, n. 23, p. 9651– 9657, 2008.

YADAV, G. D.; RAHUMAN, M. S. M. M. Cation-exchange resin-catalysed acylations and esterifications in fine chemical and perfumery industries. **Organic Process Research and Development**, vol. 6, n. 5, p. 706-713, 2002.

YU, L. J.; XU, Y.; WANG, X. Q.; YU, X. W. Highly enantioselective hydrolysis of DL-menthyl acetate to L-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 47, p. 149–154, 2007.

ZELDER, O.; HAUER, B. Environmentally directed mutations and their impact on industrial biotransformation and fermentation processes. **Current Opinion in Microbiology**, vol. 3, p. 248-251, 2000.

APÊNDICE

Apêndice 1: Curva-padrão para a determinação da concentração de butanol

Para a obtenção da curva-padrão do butanol, foram realizadas as seguintes etapas:

1) Preparo das amostras

Soluções-padrão de butanol com concentrações variando de 0,02 a 0,5 M (1-Butanol anidro 99,8%, Sigma Aldrich) foram preparadas em heptano (Heptano 99%, Sigma-Aldrich).

2) Análise em cromatógrafo a gás

As soluções-padrão foram analisadas em um cromatógrafo a gás da marca Agilent modelo 7890A GC System equipado com uma coluna HPInnowax (30 m x 0,320 mm; 0,25 μ m) e um detector de ionização em chama (DIC). Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura da coluna foi gradualmente aumentada de 100 °C (2 min) para 200 °C, a uma taxa de 30 °C/min mais 1 min a 200 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C. O volume de injeção foi de 1 μ L.

3) Determinação da curva-padrão

Os cromatogramas obtidos foram integrados e a curva de calibração foi feita relacionando as áreas dos picos com as concentrações das soluções-padrão.

