



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS - TO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

NAYRA MORGANA LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Candida viswanathii* EM
BIORREATOR DE BANCADA E IMOBILIZAÇÃO DA
ENZIMA EM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE
QUITOSANA PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

PALMAS-TO
2020

NAYRA MORGANA LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Candida viswanathii* EM
BIORREATOR DE BANCADA E IMOBILIZAÇÃO DA
ENZIMA EM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE
QUITOSANA PARA A PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de pesquisa: Biotecnologia aplicada à indústria de alimentos

Orientador: Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

Coorientador: Dr. Fabrício Coutinho de Paula Elias

PALMAS
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- O48p Oliveira, Nayra Morgana Lima de .
PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Candida viswanathii* EM BIORREATOR DE BANCADA E IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA PARA A PRODUÇÃO DE ESTERES. / Nayra Morgana Lima de Oliveira. – Palmas, TO, 2020.
138 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2020.
Orientador: Alex Fernando de Almeida
Coorientador: Fabricio Coutinho de Paula Elias

1. Biotecnologia aplicada a indústria de alimentos. 2. Enzimas industriais. 3. Bioprocessos. 4. Imobilização enzimática. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

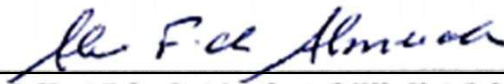
Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

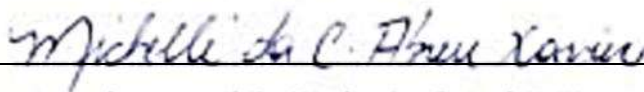
NAYRA MORGANA LIMA DE OLIVEIRA

**PRODUÇÃO DE LIPASE DE *C. viswanathii* EM BIORREATOR DE BANCADA E
IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
QUITOSANA PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES.**

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 12 de março de 2020, pela banca examinadora
constituída pelos membros:



Prof. Dr. Sergio Andres Villalba Morales (UNIFAL)



Prof^a. Dr^a. Michelle da Cunha Abreu Xavier (UFT)



Prof. Dr. Alex Fernando de Almeida

(Orientador) (UFT)

Dedico este trabalho especialmente a minha família, o meu pai José Airton, a minha mãe, Ana Lúcia, minha irmã, Nayara Allana e ao meu noivo Rômulo Caiam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me possibilitado a conclusão deste trabalho, onde na sua presença, consegui êxito em mais uma etapa da minha vida. Suas bênçãos derramadas sobre mim, conseguiram me auxiliar em diversos momentos, principalmente nos momentos de fraqueza onde sempre recorri a Ele como meu escudo.

Agradeço a minha família, meus pais, José Airton e Ana Lúcia, a minha irmã, Nayara Allana e ao meu noivo Rômulo Caiam, que me apoiaram e me deram suporte ao longo destes dois anos, sem medir esforços para me ajudar e me compreender. Agradeço a toda a minha família, que de maneira indireta sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram, como eu amo vocês palavras nenhuma podem expressar.

Ao meu orientador, professor Dr. Alex Fernando de Almeida, por ter me passado todo o conhecimento necessário para a conclusão desta dissertação. Pelas horas disponíveis que me foram oferecidas para retirada de dúvidas e correção de trabalhos. Agradeço por exigir sempre o máximo de mim, e me tornar uma pesquisadora melhor.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Fabrício Coutinho, que me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu laboratório, LABAP, e a todos que fazem parte e já fizeram parte dele, e me ajudaram de todas as formas possíveis, com empréstimo de vidrarias, reagentes, tempo e diversão nas horas difíceis. A Sabrina, Adriana, Maria Caroline, Claudiany, Manoel, Hugo, Ryhara, Lucas, Ana Beatriz, Ana Karoliny (que é minha prima e me ajudou muito nesta jornada, amo você), a todos vocês meu muito obrigada.

Agradeço ao Instituto de Pesquisa em Bioenergia - IPBEN na Universidade Estadual Paulista - UNESP, campus de Rio Claro - SP e ao Professor Dr. Jonas Contiero, que abriu as portas do laboratório para me receber e me permitir concluir parte dos meus experimentos, sem medir esforço para que eu conseguisse êxito nesta parte realizada nas dependências da universidade.

Quero agradecer também, as minhas amigas, Patricia Alana e Milena Borges, que me apoiaram e me deram palavras de consolo sempre que precisei, mesmo sem compreender a fundo o meu trabalho, me apoiaram e se mantiveram sempre ao meu lado. Agradeço a minha amiga Sara Bruna, que desde a graduação se manteve ao meu lado, me apoiando e no mestrado não foi diferente, sempre que precisei, era só chamar que ela estava de prontidão para me ajuda. Amo muito vocês.

Quero agradecer também a minha família de Palmas, Natassja e Leonardo, que me receberam com todo amor e carinho em sua casa para que eu conseguisse concluir as disciplinas do mestrado, me dando todo apoio que uma família pode dar. Eu amo muito vocês dois !

Agradeço a todos, e louvo a Deus pela vida de cada um que passou por mim neste tempo, e se manteve ao meu lado me ajudando de diversas maneiras possíveis.

Agradeço à Fundação Universidade Federal do Tocantins.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA/UFT.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos Demanda Social – DS-CAPES concedida para a permanência em dedicação exclusiva ao trabalho.

E a todos que fizeram parte desta conquista, a todos vocês meu MUITO OBRIGADA.

“A maior recompens para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.” John Ruskin

Resumo

Lipases são enzimas hidrolíticas que catalisam reações de hidrólise de triacilgliceróis na presença de água e reações de esterificação e transesterificação na ausência de água, possuindo grande destaque e importância para aplicações no setor alimentício. Este trabalho teve como objetivo selecionar fontes de carbono e nitrogênio para o cultivo submerso da levedura *Candida viwanathii* para a produção de lipase, otimizar as condições nutricionais do meio de cultivo pelo planejamento experimental DCCR, aplicar as condições otimizadas em biorreator STR e imobilizar a enzima em nanopartículas magnéticas de quitosana funcionalizada com diferentes ativadores (glutaraldeído, epícloridrina e líquido iônico) para testar a viabilidade na produção de ésteres de isoamila com diferentes ácidos graxos. Nas condições testadas, o extrato de levedura obteve os melhores resultados, com uma produção de $7,70 \text{ U.mL}^{-1}$ e como fonte de carbono não lipídica o sorbitol se destacou com uma produção enzimática de $13,66 \text{ U.mL}^{-1}$. O óleo vegetal selecionado como fonte de carbono indutora foi o óleo de soja ($12,69 \text{ U.mL}^{-1}$) na presença de sorbitol e extrato de levedura. Após o DCCR, os parâmetros nutricionais sorbitol, extrato de levedura e óleo de soja obteve a melhor condição, para as condições testadas, com a utilização de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$, 10 g.L^{-1} e $23,4 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, conseguindo uma produção de $13,56 \text{ U.mL}^{-1}$. A melhor condição no biorreator apresentou uma produção semelhante ao observado após o planejamento experimental ($13,75 \text{ U.mL}^{-1}$). As imobilizações realizadas com diferentes ativadores alcançaram rendimentos de 96,56%, 93,19%, e 83,5% para as nanopartículas ativadas com epícloridrina, glutaraldeído e líquido iônico respectivamente. Os maiores rendimentos de esterificação após 24h de reação, quando utilizado octano como solvente, foram de 12,29% para ácido láurico utilizando enzima imobilizada com líquido iônico, 14,5% para ácido mirístico utilizando enzima imobilizada com glutaraldeído, 6,65% e 6,61% para o ácido palmítico utilizando enzima imobilizada com glutaraldeído e líquido iônico, e 12,75% para o ácido esteárico utilizando enzima imobilizada com líquido iônico. Com a utilização do dimetilsulfóxido como solvente, os rendimentos de esterificação após 24h foram 40% para o ácido láurico utilizando enzima imobilizada com glutaraldeído, 50,53% para o ácido mirístico utilizando enzima imobilizada com líquido iônico, 66,25% para o ácido palmítico utilizando enzima imobilizada com glutaraldeído e 68,35% para o ácido esteárico utilizando enzima imobilizada com glutaraldeído. Assim a otimização do cultivo para aumento na produção enzimática se mostrou eficiente utilizando um óleo vegetal de baixo custo. Além disso, a imobilização da lipase em nanopartículas magnéticas de quitosana apresentou potencial para aplicações na síntese de ésteres utilizando ácidos graxos de cadeia longa como substratos. Finalmente a lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas de quitosana funcionalizadas com glutaraldeído, epícloridrina e líquido iônico se mostraram como promissores biocatalisadores com alto potencial de uso na indústria de alimentos.

Palavras-chaves: Óleos vegetais; planejamento experimental; imobilização; nanopartículas magnéticas; esterificação.

Abstract

Lipases are hydrolytic enzymes that catalyze hydrolysis reactions of triacylglycerols in the presence of water and esterification and transesterification reactions in the absence of water, having great prominence and importance for applications in the food sector. This work aimed to select carbon and nitrogen sources for the submerged cultivation of the yeast *Candida viwanathii* for the production of lipase, to optimize the nutritional conditions of the culture medium by the experimental DCCR planning, to apply the optimized conditions in STR bioreactor and to immobilize the enzyme in magnetic chitosan nanoparticles functionalized with different activators (glutaraldehyde, epichlorohydrin and ionic liquid) to test the viability in the production of isoamyl esters with different fatty acids. Under the conditions tested, the yeast extract obtained the best results, with a production of 7,70 U.mL⁻¹ and as a non-lipid carbon source, sorbitol stood out with an enzymatic production of 13,66 U.mL⁻¹. The vegetable oil selected as an inducing carbon source was soybean oil (12,69 U.mL⁻¹) in the presence of sorbitol and yeast extract. After the DCCR, the nutritional parameters sorbitol, yeast extract and soybean oil obtained the best condition, for the conditions tested, with the use of 7,5 g.L⁻¹, 10 g.L⁻¹ and 23,4 g.L⁻¹, respectively, achieving a production of 13,56 U.mL⁻¹. The best condition in the bioreactor showed a production similar to that observed after the experimental planning (13,75 U.mL⁻¹). Immobilizations performed with different activators reached yields of 96,56%, 93,19%, and 83,5% for nanoparticles activated with epichlorohydrin, glutaraldehyde and ionic liquid respectively. The highest esterification yields after 24 h of reaction, when octane was used as solvent, were 12,29% for lauric acid using enzyme immobilized with ionic liquid, 14,5% for myristic acid using enzyme immobilized with glutaraldehyde, 6,65% and 6,61% for palmitic acid using enzyme immobilized with glutaraldehyde and ionic liquid, and 12,75% for stearic acid using enzyme immobilized with ionic liquid. With the use of dimethyl sulfoxide as a solvent, the esterification yields after 24 h were 40% for lauric acid using enzyme immobilized with glutaraldehyde, 50,53% for myristic acid using enzyme immobilized with ionic liquid, 66,25% for palmitic acid using enzyme immobilized with glutaraldehyde and 68,35% for stearic acid using enzyme immobilized with glutaraldehyde. Thus, crop optimization to increase enzyme production was shown to be efficient using a low-cost vegetable oil. In addition, the immobilization of lipase in magnetic chitosan nanoparticles showed potential for applications in the synthesis of esters using long-chain fatty acids as substrates. Finally, lipase immobilized on magnetic chitosan nanoparticles functionalized with glutaraldehyde, epichlorohydrin and ionic liquid have shown to be promising biocatalysts with high potential for use in the food industry.

Keywords: Vegetable oils; experimental planning; immobilization; magnetic nanoparticles; esterification.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1: Relação de algumas enzimas microbianas e suas aplicações na indústria de alimentos.....	28
Tabela 2: Diversidade de microrganismos produtores de lipase dos anos de 2015 a 2020.....	34
Tabela 3: Delineamentos experimentais utilizados para produção de lipase de diferentes microrganismos.....	45
Tabela 4: Métodos utilizados para imobilização de lipases microbianas.....	50
Tabela 5: Aplicação de lipases microbianas para síntese de ésteres aromáticos de interesse para a indústria de alimentos.....	53

Capítulo II: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DE *Candida viswanathii* PARA PRODUÇÃO DE LIPASE

Tabela 1: Ensaios realizados pelo desing experimental DCCR.....	72
Tabela 2: Variáveis selecionadas e seus níveis atribuídos pelos DCCR.....	73
Tabela 3: Repostas obtidas com o DCCR usado para a obtenção da superfície de resposta com 3 variáveis independentes para a produção de lipase por <i>C. viswanathii</i>	82
Tabela 4: Análise de variância (ANOVA) pelo delineamento DCCR ($p \leq 0,05$)	82
Tabela 5: Estimativa de coeficientes das variáveis independentes sobre a produção de lipase por <i>C. viswanathii</i> com a utilização do DCCR.....	83
Tabela 6: Resultado predito e resultado experimental obtidos nas condições de ponto ótimo de processo.....	85

Capítulo III: IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *C. viswanathii* EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Tabela 1: Ensaios realizados para imobilização da lipase de <i>C. viswanathii</i> em nanopartículas Chi-Mag	103
Tabela 2: Níveis codificados com valores reais utilizados.....	104
Tabela 3: Resultados do rendimento de imobilização com diferentes métodos de ativação pelo delineamento Box-Behnken.....	109

Tabela 4: Análise de variância (ANAVA) pelo delineamento Box-Benken, $p \leq 0,05$ para imobilização realizada com nanopartícula ativadas com glutaraldeído.....	109
Tabela 5: Análise de variância (ANAVA) pelo delineamento Box-Benken, $p \leq 0,05$ para imobilização realizada com nanopartícula ativadas com epicloridrina.....	109
Tabela 6: Análise de variância (ANAVA) pelo delineamento Box-Benken, $p \leq 0,05$ para imobilização realizada com nanopartícula ativadas com líquido iônico.....	110
Tabela 7: Imobilização da lipase de <i>C. viswanathii</i> em diferentes métodos de imobilização.....	113
Tabela 8: Tempo de meia vida e constante de inativação (K_d) para lipase livre e imobilizada com diferentes ativadores em função da temperatura.....	119
Tabela 9: Tempo de meia vida e constante de inativação (K_d) para lipase livre e imobilizada com diferentes ativadores em função do pH.....	122
Tabela 10: Efeito de compostos químicos na atividade enzimática da enzima no extrato bruto e imobilizada com diferentes ativadores, analisada a 40 °C, pH 4, e 0,5mM de p-NPP.....	123
Tabela 11: Atividade relativa da enzima no extrato bruto e imobilizada com diferentes ativadores na presença de diferentes solventes orgânicos e diferentes álcoois.....	125
Tabela 12: Parametros cinéticos (V_{max} e K_m) para a enzima no extrato bruto e imobilizada em glutaraldeído, epicloridrina e líquido iônico para a hidrolise de p-NPP.....	126

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Esquema de atuação das enzimas na redução da energia de ativação para realização de reações bioquímicas. (Fonte: Adaptado de NELSON e COX, 2018)25
- Figura 2:** Fluxograma da classificação internacional das enzimas (Fonte: adaptado de Shoda et al. 2016)26
- Figura 3:** Estimativa de crescimento do mercado de enzimas alimentares do ano de 2019 para o ano de 2026. (Fonte: Markerts Research Report, 2019)27
- Figura 4:** Projeção de crescimento de a) enzimas mais utilizadas e b) aplicação por setor alimentício nos anos de 2019 a 2026. (Fonte: MARKERTS RESEARCH REPORT, 2019).....28
- Figura 5:** Mecanismo de reação da lipase: Desprotonação do resíduo Serina, e ataque ao carbono carbonílico do substrato para formação do intermediário tetraédrico seguida da estabilização do intermediário tetraédrico, e ataque do álcool como nucleófilo, para regeneração enzimática. Aminoácidos regenerados, e liberação do produto final. (Fonte: GODOY, et al. 2018)32
- Figura 6:** Demonstrativo de crescimento de fontes de obtenção de enzimas alimentares nos anos de 2019-2026. (Fonte: MARKERTS RESEARCH REPORT, 2019)33
- Figura 7:** Exemplificação dos métodos de imobilização enzimática (Fonte: Liu, et al 2018).....47

Capítulo II: OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DE *Candida viswanathii* PARA PRODUÇÃO DE LIPASE

- Figura 1:** a) Produção de lipase ($U.mL^{-1}$) e b) produção de biomassa ($g.L^{-1}$) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio com concentração 0,5% no meio. Letras minúsculas distintas significam que há diferenças significativas entre os meios testados num intervalo de confiança de 95%. (Fonte: Dados da pesquisa, 2019)76
- Figura 2:** Resultados de a) atividade enzimática ($U.mL^{-1}$) e b) produção de biomassa ($g.L^{-1}$) em diferentes óleos vegetais com concentração de 1% suplementado com duas fontes de carbono (Sorbitol e Glicerol a 0,5%) e uma fonte de nitrogênio (extrato de levedura a 0,5%). Letras minúsculas distintas significam que há diferenças significativas entre os meios testados num intervalo de confiança de 95%. (Fonte: Dados da pesquisa, 2019)79

Figura 3: Produção de lipase influenciada pela interação entre óleo de soja (X1), sorbitol (X2) e extrato de levedura (X3). a) interação entre X1 e X2; b) interação entre X1 e X3; c) interação entre X2 e X3 (Fonte: Dados da pesquisa, 2019).....	84
Figura 4: Cultivo em biorreator tipo tanque agitado a) realizado na ausência de sorbitol e b) com a presença de sorbitol no meio. (■) Óleo residual (▲) Biomassa e (○) Atividade enzimática. (Fonte: Dados da pesquisa, 2019).....	86
Figura 5: a) Rendimento de biomassa por substrato consumido ($Y_{X/S}$), b) Rendimento enzimático por substrato consumido ($Y_{L/S}$) c) Produtividade de lipase por hora e d) Produtividade de biomassa por h, do cultivo em biorreator do tipo tanque agitado na (■) presença de sorbitol e na (●) ausência de sorbitol para a produção de lipase por <i>C. viswanathii</i> . (Fonte: Dados da pesquisa, 2019).....	89
Figura 6: Taxa específica de produção de lipase do cultivo em biorreator do tipo tanque agitado na (■) presença de sorbitol e na (●) ausência de sorbitol para a produção de lipase por <i>C. viswanathii</i> . (Fonte: Dados da pesquisa, 2019).....	90

Capítulo III: IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *C. viswanathii* EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS

Figura 1: Nanopartículas magnéticas de quitosana a) na ausência de um campo magnético e b) na presença de um campo magnético (Fonte autor, 2020).....	103
Figura 2: Cuva de contorno desejável para imobilização de lipase de <i>C. viswanathii</i> em nanopartícula magnéticas ativadas com glutaraldeído (a), epícloridrina (b) e líquido iônico (c).....	112
Figura 3: Reutilização da lipase de <i>C. viswanathii</i> imobilizada em nanoartículas magnéticas de quitosana com diferentes ativadores. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	115
Figura 4: Temperatura ótima para atividade enzimática da enzima imobilizada em (■) Glutaraldeído; (●) Epícloridrina; (▼) Líquido Iônico e para a (▲) enzima no extrato Bruto (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	117

Figura 5: Estabilidade térmica da enzima no extrato bruto e imobilizada nas temperaturas (■) 30 °C; (●) 40 °C; (▼) 50 °C e (▲) 60 °C. a) enzima imobilizada com glutaraldeído, b) enzima imobilizada com epiclorigdrina, c) enzima imobilizada com líquido iônico e d) enzima no extrato bruto. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	118
Figura 6: pH ótimo para atividade enzimática da enzima imobilizada em (■) Glutaraldeído; (●) Epiclorigdrina; (▼) Líquido Iônico e para a (▲) enzima livre no extrato bruto. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	120
Figura 7: Estabilidade em diferentes pH da enzima imobilizada (a) Glutaraldeído; (b) Epiclorigdrina; (c) Líquido Iônico e no (d) extrato bruto. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	121
Figura 8: Rendimento de esterificação em 24 h de reação a 40 °C ± 2 °C e 180 rpm, na presença do solvente octano e álcool isoamílico com a) ácido láurico (C12), b) ácido mirístico (C14), c) ácido palmítico (C16) e d) ácido esteárico (C18). GA:Enzima imobilizada com ativador glutaraldeído; EP: Enzima imobilizada com ativador epiclorigdrina; LI: Enzima imobilizada com ativador líquido iônico; EB: Enzima imobilizada com ativador líquido iônico. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	128
Figura 9: Rendimento de esterificação em 24 h de reação a 40 °C ± 2 °C e 180 rpm, na presença do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e álcool isoamílico com a) ácido láurico (C12), b) ácido mirístico (C14), c) ácido palmítico (C16) e d) ácido esteárico (C18). GA: Enzima imobilizada com ativador glutaraldeído; EP: Enzima imobilizada com ativador epiclorigdrina; LI: Enzima imobilizada com ativador líquido iônico; EB: Enzima imobilizada com ativador líquido iônico. (Fonte: Dados da pesquisa, 2020).....	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA: Análise de variância

ATP: Adenosina tri-fosfato

BDA: Batata, dextrose, água

C/N: razão carbono por nitrogênio

CES: Cultivo em estado sólido

Chi-Mag: Nanopartículas magnéticas de quitosana

CSm: Cultivo submerso

DCC: Delineamento composto central

DCCR: Delineamento composto central Rotacional

DNA: ácido dexorribonucleico

E.C.: Enzyme Commission

h: hora

H₂SO₄: ácido sulfúrico

IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology

K₂HPO₄: Fosfato de potássio Bibásico

K_d: Constante de inativação

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

Mg: Magnésio

MgSO₄: Sulfato de Magnésio

min: Minutos

mM: miliMolar

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

OFAT: One-Factor-at-a-time

P_L : produtividade enzimática por hora de cultivo

p-NPP: para nitrofenil de palmitato

P_x : produtividade de biomassa

q_L : taxa específica de produção de lipase

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotação por minuto

STR: Biorreator de tanque agitado

$t_{1/2}$: Tempo de meia vida

vvm: volume de ar por minuto

$Y_{L/S}$: Rendimento enzimático por substrato consumido

$Y_{X/S}$: Rendimento de biomassa por substrato consumido

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	23
Objetivo Geral	23
Objetivos Específicos	23
Capítulo I	24
REVISÃO DE LITERATURA	24
1 ENZIMAS	25
1.1 Classificação das enzimas	26
1.2 Tecnologia enzimática na indústria de alimentos	27
2 LIPASES	30
2.1 Mecanismo de Ação	31
2.2 Fontes de Obtenção	32
2.3 Lipases Microbianas	33
2.4 Processo de Produção de lipases microbianas	36
2.4.1 Fatores nutricionais.....	37
2.4.2. Fontes indutoras para síntese de lipase	39
2.4.3. Cultivo em estado sólido e Cultivo submerso	40
2.4.3.1. Cultivo em Biorreator.....	42
3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	43
4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	46
4.1 Imobilização de Lipases	48
5 UTILIZAÇÃO DE LIPASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	50
5.1 Síntese de ésteres aromáticos	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPÍTULO II	67
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO SUBMERSO DE <i>Candida viswanathii</i> PARA PRODUÇÃO DE LIPASE	67
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.1. Microrganismo e condições de cultura	71
2.2. Cultivo Submerso	71
2.2.1. Seleção de Fontes de Carbono e Nitrogênio	71
2.2.2. Seleção de óleos vegetais	72

2.2.3.	<i>Otimização do cultivo submerso</i>	72
2.2.4.	<i>Validação</i>	73
2.2.5.	<i>Cultivo em biorreator de bancada</i>	74
2.2.6.	<i>Obtenção do extrato bruto</i>	74
2.3.	Determinação da atividade enzimática	74
2.4.	Quantificação de proteínas totais	75
2.5.	Determinação de óleo residual	75
2.6.	Determinação de biomassa	75
2.7.	Análise dos resultados	75
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1.	Seleção de fontes de Carbono e Nitrogênio	76
3.2.	Seleção de óleos vegetais	79
3.3.	Otimização das condições de cultivo pelo DCCR	81
3.4.	Validação do modelo matemático	85
3.5.	Cultivo em biorreator de bancada	86
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
5.	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
CAPÍTULO III: IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE <i>C. viswanathii</i> EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA: PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS E ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS		
1.	INTRODUÇÃO	100
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	101
2.1.	Microrganismo	101
2.2.	Cultivo líquido e obtenção de extrato bruto	101
2.3.	Determinação de Atividade enzimática	102
2.4.	Determinação de proteínas totais	102
2.5.	Formulação de nanopartículas magnéticas de quitosana	102
2.6.	Imobilização da lipase	103
2.6.1.	Delineamento experimental Box-Benken	103
2.6.2.	Ativação das Chi-Mag	104
2.6.3.	Imobilização de lipase em Chi-Mag	104
2.6.3.1.	Rendimento de imobilização	104
2.6.3.2.	Atividade Específica	105
2.7.	Caracterização bioquímica de lipase livre e imobilizada	105

2.7.1.	Reuso da Lipase.....	105
2.7.2.	Estabilidade térmica e temperatura ótima	105
2.7.3.	pH ótimo e estabilidade em pH	105
2.7.4.	Influência de solventes orgânicos na atividade	106
2.7.5.	Influência de íons metálicos na atividade.....	106
2.7.6.	Tempo de meia vida	106
2.7.7.	Parâmetros cinéticos.....	106
2.8.	Síntese de ésteres aromáticos	107
2.8.1.	Determinação da formação de ésteres	107
2.8.1.1.	Teor de ácido carboxílico	107
2.8.1.2.	Percentual de esterificação	107
2.9.	Análise dos resultados.....	108
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1.	Delineamento para imobilização	108
3.2.	Validação	113
3.3.	Caracterização bioquímica da enzima no extrato Bruto e imobilizada.....	115
3.3.1.	Reuso da enzima.....	115
3.3.2.	Estabilidade térmica e temperatura ótima	116
3.3.3.	Estabilidade em pH e pH ótimo.....	120
3.3.4.	Influência de íons metálicos sobre a atividade	123
3.3.5.	Influência de solventes orgânicos sobre a atividade.....	124
3.3.6.	Parâmetros cinéticos.....	126
3.4.	Síntese de ésteres aromáticos	127
3.4.1.	Esterificação de ácidos graxos em meio de solvente octano	127
3.4.2.	Esterificação de ácidos graxos em meio de solvente DMSO	130
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	133
5.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	133
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
	CONCLUSÃO GERAL	138