



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular
Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação

Pedro Alves Martins

Orientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco

Coorientadora: Dra. Thaís Fabiana Chan Salum

Laboratório de Biologia Molecular

Embrapa Agroenergia

Brasília, Junho de 2021



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Pós-Graduação em Biologia Microbiana

Lipases microbianas: prospecção, produção e aplicação

Pedro Alves Martins

Orientadora: Prof. Dra. Janice Lisboa De Marco

Coorientadora: Dra. Thaís Fabiana Chan Salum

Laboratório de Biologia Molecular

Embrapa Agroenergia

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Brasília, Junho de 2021

*“Around here, however, we don’t look backwards for very long. We **keep moving forward**, opening up new doors and doing new things, because we’re curious and curiosity keeps leading us down new paths.”*

(Walt Disney)

Agradecimentos

“One of the lessons I have learned in the different stages of my career is that science is not done alone. It is through talking with others and sharing that progress is made. Work done today, of course, builds on the past work of many others, but in addition, experiments are often suggested by friends and colleagues either directly or indirectly. The ideas generated are not always the result of one person’s thoughts but of the interaction between people; new ideas quickly become part of collective consciousness. This is how science moves forward and we generate new knowledge.”

Carol W. Greider (Nobel Laureate in Physiology or Medicine, 2009)

Agradeço primeiramente a Deus, por me apresentar tantas boas oportunidades e pessoas ao longo desta jornada. “Porque tudo vem de ti, e das tuas mãos to damos.” (1 Crônicas 29:14b);

Aos meus pais Isaias e Célia, como representantes de toda minha família, pelo amor e apoio incondicionais e por todos os incentivos sempre;

Às minhas orientadoras Janice e Thaís, pela orientação dedicada e por acreditarem neste trabalho e terem aceitado e conduzido a realização deste desafio até sua concretização. Obrigado pela amizade, por estarem presentes nos momentos descontraídos e também naqueles mais sérios, e pelos conselhos e contribuições valiosas para a realização deste trabalho;

A todos os amigos e colegas da Embrapa Agroenergia que me acolheram durante estes anos. São inúmeros, mas registro alguns nomes como representantes deste exército de cientistas dedicados e amigos preciosos: Amanda, Antoniele, Ariel, Brenda, Bruna, Bruno, Caio, Carol, Cibele, Clara, Daiana, Débora, Diogo, Elias, Gláucia, Helder, Hugo, Isabela, Jade, Jamille, Karoline, Luana, Mariana, Mayume, Paula, Renan, Tallyta, Thályta, Thaís e Wilson. Obrigado pelas conversas descontraídas na bancada em meio a infinitos Erlenmeyers e opiniões essenciais para o andamento deste trabalho. Vocês fazem parte da minha trajetória;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UnB: Ana, Carmen, Carol, Catarina, Cecília, Chris, Dani, Francisco, Igor, Jacob, Júlia, Luíza, Murilo,

Myrna, Pedro, Roberta, Tiago, Vanessa e Yasmin. Obrigado por cada almoço na copa, cada ajuda na bancada e também por tantos momentos de descontração. Lab2 rainha!;

A José Guisán por haber aceptado recibirme en Madrid, brindándome momentos de gran crecimiento personal y profesional. Gracias por todo el apoyo científico, el conocimiento compartido y por tanta dedicación y paciencia con las que siempre me habéis orientado. Mi estancia en Madrid seguramente ha sido un momento especial para mi desarrollo como investigador;

A mis compañeros de laboratório en el ICP y en el CIAL que rápidamente se convirtieron en mis amigos: Ernes, Fran, Fred, Gao, Glória, Janaina, Javi, Lara, María, Paulina, Rita, Sílvia y Wilson. Habéis aportado mucho a mi experiencia en Madrid y seguramente puedo decir que os llevo en mi corazón. Gracias por todo;

À Embrapa Agroenergia por toda estrutura fornecida. Como representantes de todos os funcionários, agradeço aos analistas e pesquisadores que contribuíram com minha formação e para execução deste trabalho: Betânia, Carol Poletto, Dasciana, Diogo, Félix, João, José Antônio, Léia, Mônica, Patrícia Kalil, Raquel, Sílvia, Thályta e Thaís Demarchi;

À Universidade de Brasília, minha casa por tantos anos. Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, pela estrutura fornecida e oportunidade e confiança para me receber como aluno. Em especial, agradeço aos professores Fernando, Lídia e Viviane que tanto contribuíram à minha formação e também com este trabalho;

Ao apoio financeiro recebido dos órgãos de fomento à ciência e à educação. À CAPES, pela concessão das bolsas de estudo no Brasil e no exterior. À FAPDF pelo suporte e apoio para divulgação desta pesquisa por meio da participação em eventos científicos. À FINEP e ao CNPq pelo financiamento dos projetos de pesquisa que possibilitaram insumos e condições para a execução deste trabalho.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo a produção de lipases por fermentação em estado sólido com microrganismos isolados de dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.). Após prospecção dos microrganismos isolados, destacaram-se pela alta atividade lipolítica o fungo filamentosso *Aspergillus* sp. (BDA-FI-7) e a bactéria *Burkholderia gladioli* BRM58833. Os parâmetros para o cultivo por fermentação em estado sólido foram otimizados, sendo as maiores atividades lipolíticas obtidas de $68,5 \pm 5,4$ e $1096,7 \pm 39,3$ U.gss⁻¹ (unidades de atividade lipolítica por grama de sólido seco) para o fungo e a bactéria, respectivamente, quando avaliadas pela hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila. Quando utilizada trioleína como substrato, as maiores atividade lipolíticas encontradas foram de $7,7 \pm 0,7$ e $374,2 \pm 20,4$ U.gss⁻¹ para o fungo e a bactéria, respectivamente. Como as atividades obtidas para a lipase bacteriana foram mais promissoras que as do fungo, o restante do estudo foi focado na lipase bacteriana. A análise proteômica do extrato produzido pela bactéria revelou que, para as condições otimizadas de cultivo, são secretadas duas esterases e três lipases verdadeiras. Quando purificada, a lipase BGL mostrou preferência por substratos de cadeia longa sendo a maior atividade lipolítica observada a 50 °C e pH 9. Além disso, a lipase foi resistente a solventes e exibiu uma termoestabilidade expressiva quando comparada a outras lipases, revelando o potencial desta enzima em reações de hidrólise e síntese de ésteres. A síntese de biodiesel foi estudada com o uso dos sólidos fermentados obtidos do cultivo da bactéria. Os maiores teores de ésteres etílicos foram de $67,3 \pm 1,7$ e $74,7 \pm 3,8\%$ em 120 h para as reações em óleo de soja refinado e óleo de palma bruto, respectivamente. Adicionalmente, BGL foi imobilizada e estabilizada por diferentes técnicas e abordagens, resultando em derivados 263,8 e 70,1 vezes mais estáveis à inativação a 60 °C e pH 10, respectivamente. Resultados preliminares na hidrólise de óleo de peixe demonstraram o potencial da técnica de revestimento com polímeros bifuncionais para obtenção de um derivado estável e com maior capacidade catalítica para produção de PUFA's ômega-3, atingindo uma atividade de hidrólise de $0,207 \pm 0,002$ U.mg⁻¹. Por fim, BGL foi clonada em *Escherichia coli* encontrando-se uma atividade lipolítica extracelular de $71,3 \pm 1,8$ U.mg⁻¹ para as melhores condições de cultivo.

Palavras-chave: Lipase. Biodiesel. Ômega-3. Imobilização. Fermentação em estado sólido. *Burkholderia gladioli* BRM58833. *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7).

Abstract

The goal of this work was to produce lipases by solid state fermentation with microorganisms isolated from the oil palm tree (*Elaeis guineenses* Jacq.). After evaluation of the isolated microorganisms, the filamentous fungus *Aspergillus* sp. (BDA-FI-7) and the bacterium *Burkholderia gladioli* BRM58833 stood out for their high lipolytic activity. The parameters for cultivation by solid state fermentation were optimized, obtaining lipolytic activities of 68.5 ± 5.4 and 1096.7 ± 39.3 U.gds⁻¹ (units of lipolytic activity per gram of dry solid) for the fungus and bacterium, respectively, when evaluated by the hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate. When using triolein as substrate, lipolytic activities were 7.7 ± 0.7 and 374.2 ± 20.4 U.gds⁻¹ for the fungus and bacterium, respectively. As the activities obtained for the bacterial lipase were more promising than those for the fungus, the rest of the study was focused on the bacterial lipase. Proteomic analysis of the extract produced by the bacterium revealed that, for optimized culture conditions, two esterases and three true lipases are secreted. When purified, BGL lipase preferred long-chain substrates with the highest lipolytic activity observed at 50 °C and pH 9. In addition, BGL was resistant to solvents and exhibited an expressive thermostability when compared to other lipases, revealing the potential of this enzyme in reactions of hydrolysis and synthesis of esters. The synthesis of biodiesel was studied with use of the fermented solids obtained from the cultivation of the bacterium. The highest levels of ethyl esters were 67.3 ± 1.7 and $74.7 \pm 3.8\%$ in 120 h for the reactions in refined soybean oil and crude palm oil, respectively. Additionally, BGL was immobilized and stabilized by different techniques and approaches, resulting in derivatives 263.8 and 70.1 times more stable to inactivation at 60 °C and pH 10, respectively. Preliminary results in the hydrolysis of fish oil demonstrated the potential of the coating with bifunctional polymers to obtain a stable derivative with greater catalytic properties for the production of omega-3 PUFAs, reaching an hydrolysis activity of 0.207 ± 0.002 U.mg⁻¹. Finally, BGL was cloned in *Escherichia coli* with an extracellular lipolytic activity of 71.3 ± 1.8 U.mg⁻¹ for the best culture conditions.

Keywords: Lipase. Biodiesel. Omega 3. Immobilization. Solid-State Fermentation. *Burkholderia gladioli* BRM58833. *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7).

Índice

Lista de Figuras.....	I
Lista de Tabelas.....	IV
Lista de Abreviaturas	VI
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. Lipases.....	2
1.1 Visão geral	2
1.2 Estrutura e mecanismo de reação	4
1.3 Classificação em famílias	9
2. Prospecção de microrganismos produtores de lipase	13
2.1 Microrganismos associados ao dendezeiro	14
3. Produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES).....	16
3.1 Substratos e suportes	17
3.2 Temperatura de cultivo	19
3.3 Umidade e tamanho da partícula	20
4. Imobilização e estabilização de lipases.....	21
5. Lipases na produção de biocombustíveis	25
5.1 Biodiesel	25
5.2 Síntese enzimática de biodiesel.....	29
6. Lipases na produção de ácidos graxos poli-insaturados Ômega-3	31
7. Outras aplicações industriais de lipases	34
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVOS	37
Objetivo geral	37
Objetivos específicos	37
CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO DENDEZEIRO (<i>ELAEIS GUINEENSIS</i> JACQ.): PRODUÇÃO DE LIPASES DE <i>ASPERGILLUS</i> SP. (BDA-FI 7) E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS	40
1. Objetivos	40
2. Metodologia.....	40
2.1 Materiais prospectados	40
2.2 Meios de cultura	41
2.3 Isolamento dos microrganismos.....	41
2.4 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos	43

2.5 Cultivo dos microrganismos por fermentação em estado sólido (FES)	44
2.6 Identificação Molecular por ITS	45
2.7 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	46
2.8 Análises Estatísticas	48
2.9 Síntese de Ésteres Etílicos	49
2.10 Quantificação de Ésteres Etílicos	50
3. Resultados e Discussão	50
3.1 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase	50
3.2 Otimização da produção de lipases por <i>Aspergillus</i> sp. BDA-FI 7	59
3.3 Síntese de Ésteres Etílicos com SFL de <i>Aspergillus</i> sp. (BDA-FI 7)	69
4. Conclusões	71
CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS FRUTOS DE DENDÊ (<i>ELAEIS GUINEENSIS</i> JACQ.) E SEU	
POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES	72
1. Objetivos	72
2. Metodologia	72
2.1 Coleta de frutos de dendê	72
2.2 Isolamento de bactérias epifíticas	72
2.3 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos	73
2.4 Identificação dos isolados por sequenciamento 16S	73
2.5 Fermentação em Estado Sólido	74
2.6 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	74
2.7 Cinética de produção de lipases	74
2.8 Síntese de Ésteres Etílicos	74
2.9 Quantificação de ésteres etílicos por HPLC	75
2.10 Montagem e anotação do genoma	75
3. Resultados e Discussão	76
3.1 Isolamento e seleção de bactérias produtoras de lipase	76
3.2 Seleção de bactérias por fermentação em estado sólido	78
3.3 Hidrólise de substratos naturais	83
3.4 Síntese de ésteres etílicos	84
3.5 Análise do genoma de <i>B. gladioli</i> BRM58833	85
4. Conclusões	87
CAPÍTULO III – PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LIPASE ALCALINA DE	
<i>BURKHOLDERIA GLADIOLI</i> BRM58833	88
1. Objetivos	88

2. Metodologia.....	88
2.1 Microrganismo.....	88
2.2 Curva de crescimento de <i>B. gladioli</i> BRM58833	88
2.3 Fermentação em estado sólido (FES).....	89
2.4 Otimização das condições de extração das lipases.....	90
2.5 Cinética de produção de lipases	91
2.6 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	91
2.7 Análise do secretoma de <i>B. gladioli</i> BRM58833 por LC-MS/MS	91
2.12 Análises Estatísticas	94
2.13 SDS-PAGE	94
2.14 Estabilidade térmica	95
3. Resultados e Discussão	96
3.1 Otimização do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 para produção de lipases	96
3.2 Otimização da extração de lipases dos SFL obtidos do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 ..	100
3.3 Cinética de produção de lipases	106
3.4 Análise do secretoma de <i>B. gladioli</i> BRM58833	109
3.5 Caracterização do extrato enzimático bruto obtido	111
3.6 Estabilidade térmica	118
4. Conclusões	119
CAPÍTULO IV – SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE SÓLIDOS FERMENTADOS POR <i>BURKHOLDERIA GLADIOLI</i>	
BRM58833: OTIMIZAÇÃO E REUSO.....	120
1. Objetivos.....	120
2. Metodologia.....	120
2.1 Materiais Utilizados	120
2.2 Produção dos sólidos fermentados	120
2.3 Utilização de Diferentes Óleos para Síntese de Ésteres Etílicos	121
2.4 Otimização Das Condições De Síntese De Ésteres Etílicos.....	121
2.5 Reação de Síntese de Ésteres Etílicos em Batelada Alimentada.....	122
2.6 Reutilização dos Sólidos Fermentados	123
2.7 Quantificação de Ésteres Etílicos e Produtos Intermediários	123
3. Resultados e Discussão	124
3.1 Utilização de Diferentes Óleos para Síntese de Ésteres Etílicos	124
3.2 Otimização Das Condições De Síntese De Ésteres Etílicos.....	127
3.3 Síntese de Ésteres Etílicos em Batelada Alimentada	132
3.4 Reutilização dos Sólidos Fermentados	133

4. Conclusões	138
CAPÍTULO V – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA GLADIOLI</i> BRM58833	140
1. Objetivos	140
2. Metodologia.....	140
2.1 Produção da lipase.....	140
2.2 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	140
2.3 Determinação da concentração de proteínas totais	141
2.4 Purificação de lipases.....	141
2.5 SDS-PAGE	142
2.12 Análises Estatísticas	143
3. Resultados e Discussão	143
3.1 Purificação da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833	143
3.2 Atividade frente a diferentes substratos	146
3.3 Efeito de íons, surfactantes e solventes	146
3.4 Efeito da temperatura e do pH.....	149
3.5 Determinação de parâmetros cinéticos: Km e V _{máx}	150
3.6 Estabilidade térmica	151
4. Conclusões	152
CAPÍTULO VI – IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>BURKHOLDERIA GLADIOLI</i> BRM58833 PARA PRODUÇÃO DE ÔMEGA-3 POR HIDRÓLISE DE ÓLEO DE PEIXE.....	153
1. Objetivos	153
2. Metodologia.....	153
2.1 Construção de um modelo estrutural da lipase.....	153
2.2 Produção da lipase.....	153
2.3 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	154
2.4 Purificação e imobilização em Sulfopropil Sepharose	154
2.5 Imobilização em glioxil agarose	155
2.6 Imobilização em suportes hidrofóbicos.....	155
2.7 Parâmetros de imobilização	156
2.8 Determinação de parâmetros cinéticos: Km e V _{máx}	156
2.9 Adsorção de polímeros hidrofílicos	156
2.10 Entrecruzamento com dextrano-aldeído.....	157
2.11 Construção de uma bicamada polimérica de DEXa e NH ₂ -PEG	157
2.12 Análise de estabilidade	158
2.13 Hidrólise do óleo de peixe	158

3. Resultados e Discussão	159
3.1 Imobilização da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833.....	159
3.2 Estabilização dos derivados com técnicas de pós-imobilização	166
3.3 Comparação com a lipase comercial de <i>B. cepacia</i>	175
3.4 Hidrólise do óleo de peixe	176
4. Conclusões	181
CAPÍTULO VII – EXPRESSÃO HETERÓLOGA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LIPASE BGL EM ESCHERICHIA COLI....	182
1. Objetivos	182
2. Metodologia.....	182
2.1 Linhagens e meios de cultura	182
2.2 Amplificação de Lip e Lif por PCR.....	183
2.3 Eletroforese em gel de agarose	184
2.4 Construção dos vetores	184
2.5 Confirmação das sequências das construções.....	185
2.6 Preparo de células DH5 α competentes e transformação.....	185
2.7 Extração de DNA plasmidial.....	186
2.8 Preparo de células competentes BL21(DE3)pLysS e transformação	187
2.9 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos	187
2.10 Testes de expressão.....	187
2.11 Fracionamento celular	188
2.12 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica	189
2.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	189
3. Resultados e Discussão	189
3.1 Construção dos sistemas de expressão	189
3.2 Triagem de clones produtores de lipase.....	195
3.3 Otimização da produção da lipase.....	198
4. Conclusões	202
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	203
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	205
ANEXOS	228

Lista de Figuras

Figura 1	Reação de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipase.....	02
Figura 2	Reações catalisadas por lipases em ambientes aquo-restritos.....	03
Figura 3	Estrutura das α/β -hidrolases.....	06
Figura 4	Equilíbrio das conformações fechada e aberta da lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>	07
Figura 5	Mecanismo de reação proposto para a hidrólise de ésteres catalisada por lipases.....	09
Figura 6	Estratégias de imobilização de enzimas.....	23
Figura 7	Exemplo de moléculas que compõem o biodiesel e o diesel convencional.....	27
Figura 8	Evolução da mistura de biodiesel no Brasil.....	28
Figura 9	Fluxograma da estrutura da parte experimental do trabalho.....	38
Figura I.1	Exemplos da diversidade de fungos filamentosos isolados.....	51
Figura I.2	Testes qualitativos para determinação da secreção de lipases por microrganismos.....	52
Figura I.3	Análise por cromatografia em camada delgada das amostras obtidas da reação de síntese de biodiesel com o uso de sólidos fermentados.....	58
Figura I.4	Cultivos de <i>Aspergillus</i> sp. (BDA-FI 7) por FES em diferentes substratos/suportes e soluções umidificadoras.....	60
Figura I.5	Cultivos de <i>Aspergillus</i> sp. (BDA-FI 7) por FES em farelo de trigo e diferentes soluções umidificadoras e óleos indutores	61
Figura I.6	Análise estatística do DCCR para otimização da produção de lipases pelo fungo BDA-FI 7 por FES.....	64
Figura I.7	Análise por cromatografia em camada delgada das amostras obtidas da reação de transesterificação.....	70
Figura II.1	Atividade lipolítica relativa de extratos brutos obtidos do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 por FES por seis dias.....	82
Figura II.2	Análise filogenética.....	85
Figura III.1	Curva de crescimento da bactéria <i>B. gladioli</i> BRM58833 em meio LB.....	96
Figura III.2	Cultivos de <i>B. gladioli</i> BRM58833 por FES em farelo de trigo usando diferentes soluções umidificadoras e óleos indutores.....	97
Figura III.3	Atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos brutos de <i>B. gladioli</i> BRM58833 obtidos com diferentes soluções extratoras.....	101
Figura III.4	Produção de lipases para diferentes dias de cultivo em condições otimizadas de cultivo e extração.....	106

Figura III.5	Atividade lipolítica <i>in gel</i> do extrato enzimático bruto.....	111
Figura III.6	Avaliação da atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 frente a substratos sintéticos e naturais.....	112
Figura III.7	Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 em trioleína	113
Figura III.8	Efeito da temperatura na estabilidade do extrato lipolítico bruto.....	119
Figura IV.1	Utilização de diferentes óleos como substrato para síntese de ésteres etílicos.....	126
Figura IV.2	Superfícies de resposta obtida para a síntese de ésteres etílicos em função da temperatura e da quantidade de água adicionada ao meio reacional.....	128
Figura IV.3	Efeito da concentração inicial de álcool etílico na reação de transesterificação.....	131
Figura IV.4	Teores de ésteres etílicos observados para uma reação de síntese em condições de batelada alimentada.....	132
Figura IV.5	Reuso dos SFL obtidos do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 para reação de transesterificação em meio reacional otimizado e síntese de ésteres etílicos.....	134
Figura IV.6	Quantificação dos analitos referentes ao substrato e aos produtos intermediários da reação de transesterificação após a utilização dos SFL de <i>B. gladioli</i> BRM58833 como biocatalisador em sucessivos ciclos de utilização.....	136
Figura V.1	SDS-PAGE e zimograma das frações relativas ao processo de purificação....	145
Figura V.2	Atividade lipolítica de BGL frente a substratos sintéticos e naturais.....	146
Figura V.3	Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade lipolítica de BGL.....	149
Figura V.4	Cinética michaeliana de BGL.....	150
Figura V.5	Perfil de inativação de BGL a diferentes temperaturas.....	152
Figura VI.1	Imobilização em agarose ativada com grupos glioxil.....	161
Figura VI.2	Modelo estrutural da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833.....	162
Figura VI.3	Imobilização da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833 em octil sepharose.....	165
Figura VI.4	Estabilização da enzima por revestimento com polietilenimina.....	168
Figura VI.5	Dextrano-aldeído como base para a construção de uma camada bifuncional de metoxipolietilenoglicol amina e glicina em torno da superfície da enzima...	173
Figura VI.6	Curso de inativação térmica de derivados de lipases de <i>B. cepacia</i> e <i>B. gladioli</i> BRM58833.....	176
Figura VI.7	Hidrólise de óleo de peixe para obtenção de ácido docosahexaenóico.....	178
Figura VI.8	Uso de derivados estabilizados da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833 para a hidrólise de óleo de peixe.....	179
Figura VII.1	Mapa do vetor pET-21a+.....	190

Figura VII.2	Amplificação dos fragmentos <i>LIP</i> -his, <i>LIP</i> e <i>LIP-LIF</i>	192
Figura VII.3	Mapa do vetor pET-LIP-his.....	193
Figura VII.4	Mapa do vetor pET-LIP.....	193
Figura VII.5	Mapa do vetor pET-LIP-LIF.....	194
Figura VII.6	Linearização dos vetores construídos.....	195
Figura VII.7	Avaliação qualitativa da produção de lipases.....	196
Figura VII.8	Avaliação da produção de lipases por SDS-PAGE e zimograma nas frações intracelulares após indução com IPTG por 2 h.....	196
Figura VII.9	Análise do fracionamento celular por SDS-PAGE e zimograma do cultivo da linhagem transformada com pET-LIP-LIF.....	198
Figura VII.10	Atividades intracelular e extracelular obtidas para a linhagem pET-LIP-LIF em diferentes meios de cultura.....	199
Figura VII.11	Indução da produção da lipase em meio LB a 18 °C.....	201

Lista de Tabelas

Tabela 1	Classificação das enzimas lipolíticas bacterianas da Família I.....	10
Tabela 2	Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino convencional para a produção de biodiesel.....	30
Tabela 3	Lipases comercialmente disponíveis e suas aplicações industriais.....	35
Tabela I.1	Microrganismos isolados e resultados da triagem qualitativa em meios seletivos para prospecção de produtores de lipase.....	54
Tabela I.2	Atividade lipolítica dos sólidos fermentados obtidos do cultivo de microrganismos em torta de dendê por FES.....	55
Tabela I.3.	Atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos do cultivo dos fungos BDA 24, BDA-FI 7 e BDA-FI 8.1 por FES.....	57
Tabela I.4	DCCR com variáveis reais e codificadas para otimização do cultivo de <i>Aspergillus sp.</i> (BDA-FI 7) por FES.....	63
Tabela I.5	Resultado dos cultivos de validação dos modelos obtidos pelo DCCR para otimização da produção de lipases por FES.....	66
Tabela I.6	Atividades lipolíticas referentes ao cultivo de 7 dias do fungo <i>Aspergillus sp.</i> (BDA-FI 7) frente a substratos naturais.....	68
Tabela II.1	Classes fenotípicas de 664 bactérias epifíticas isoladas de frutos de dendê....	77
Tabela II.2	Identificação do gene 16s das 18 bactérias avaliadas por Fermentação no Estado Sólido.....	79
Tabela II.3	Atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos do cultivo de linhagens selecionadas de bactérias epifíticas por FES.....	80
Tabela II.4	Atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 frente a substratos naturais.....	83
Tabela II.5	Anotação do genoma de <i>B. gladioli</i> BRM58833 e estatísticas de montagem....	86
Tabela III.1	DCCR com variáveis reais e codificadas para otimização do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 por FES.....	98
Tabela III.2	DCCR com variáveis reais e codificadas para otimização da extração de lipases do cultivo de <i>B. gladioli</i> BRM58833 por FES.....	104
Tabela III.3	Atividades lipolíticas encontradas na literatura referentes ao cultivo de microrganismos por fermentação em estado sólido.....	108
Tabela III.4	Proteínas com atividade lipolítica presentes no secretoma de <i>B. gladioli</i> BRM58833.....	111
Tabela III.5	Efeito de aditivos na atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de <i>Burkholderia gladioli</i> BRM58833.....	116
Tabela IV.1	DCCR com variáveis reais e codificadas para otimização das condições de síntese de FAEE pelos SFL de <i>B. gladioli</i> BRM58833.....	127

Tabela V.1	Etapas de purificação da lipase produzida por <i>Burkholderia gladioli</i> BRM58833 por fermentação em estado sólido em farelo de trigo.....	144
Tabela V.2	Efeito de aditivos sobre a atividade lipolítica de BGL.....	148
Tabela VI.1	Imobilização e estabilidade térmica das lipases de <i>B. gladioli</i> BRM58833 e <i>B. cepacia</i> em diferentes suportes.....	160
Tabela VI.2	Estabilização térmica das lipases de <i>B. gladioli</i> BRM58833 e <i>B. cepacia</i> imobilizadas em octil sepharose com revestimento de polímeros policatiônicos e dextrano-aldeído.....	170
Tabela VI.3	Estabilização térmica da lipase de <i>B. gladioli</i> BRM58833 imobilizada em octil sepharose com dextrano-aldeído e polímeros bifuncionais.....	172
Tabela VI.4	Estabilização dos derivados imobilizados das lipases de <i>B. gladioli</i> BRM58833 e <i>B. cepacia</i> em pH alcalino.....	174
Tabela VI.5	Hidrólise de óleo de peixes marinhos.....	180
Tabela VII.1	Sequência dos primers utilizados neste trabalho.....	184

Lista de Abreviaturas

ANOVA	Análise de Variância	MES	Metil-Estibeno
BDA	Meio Batata Dextrose Ágar	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
BGL	Lipase de <i>Burkholderia gladioli</i>	NH₂-PEG	Metoxipolietilenoglicol Amina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	OCT	Octil Sepharose
BUT	Butil Sepharose	PAA	Polialilamina
C18	<i>Octodecil Sepabeads</i>	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
CCD	Cromatografia em Camada Delgada	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
CG	Cromatografia Gasosa	PDA	<i>Photodiode-Array Detection</i>
DAG	Diacilglicerol	PEI	Polietilenimina
DCCR	Delineamento do Composto Central Rotacional	PHE	Fenil Sepharose
DEXa	Dextrano-Aldeído	pNP	<i>p-nitrophenol</i>
DHA	Ácido Docosahexaenóico	pNPA	<i>p-nitrophenyl Acetate</i>
EBL	Extrato Bruto Liofilizado	pNPB	<i>p-nitrophenyl Butyrate</i>
EC	<i>Enzyme Commission Number</i>	pNPC	<i>p-nitrophenyl Caprylate</i>
ELSD	<i>Evaporative Light-Scattering Detector</i>	pNPL	<i>p-nitrophenyl Laurate</i>
EPA	Ácido Eicosapentaenóico	pNPP	<i>p-nitrophenyl Palmitate</i>
FAEE	<i>Fatty Acid Ethyl Esters</i>	PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>	SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Desnaturante
FES	Fermentação em Estado Sólido	SB	Meio <i>Super Broth</i>
FFA	<i>Free Fatty Acids</i>	SFL	Sólidos Fermentados Liofilizados
GLA	Glioxil Agarose	SOC	Meio <i>Modified Super Optimal Broth</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	SP	Sulfopropil Sepharose
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>	TAG	Triacilglicerol
IPTG	<i>Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo</i>	TB	Meio <i>Terrific Broth</i>
K_m	Constante de Michaelis-Menten	U	Unidade Internacional (μmol/minuto)
LB	Meio Caldo Luria-Bertani	U.gss⁻¹	Unidades Internacionais por Grama de Sólidos Secos
LBA	Meio Luria-Bertani Ágar	UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
LEW	<i>Lewatit 1600</i>	UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
M9	Meio Mínimo	V_{máx}	Velocidade Máxima da Reação
MAG	Monoacilglicerol	YPG	Meio <i>Yeast Extract, Peptone, Glucose</i>

INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas em diferentes processos industriais representa uma alternativa sustentável aos processos químicos convencionais e tem, cada vez mais, conquistado seu espaço por apresentar tanto benefícios econômicos quanto baixos impactos ambientais. As enzimas são biocatalisadores altamente eficientes que apresentam alta seletividade, podendo ser aplicados a diferentes setores da indústria. Além disso, o uso destes biocatalisadores pode ser feito em condições amenas de temperatura, pressão e pH, demandando menos energia e reduzindo a quantidade de resíduos gerados quando comparado aos processos convencionais (Sheldon, 2011; Zdarta *et al.*, 2018).

Segundo Chapman e colaboradores (2018), o uso de enzimas já tem sido mais implementado em escala comercial para as indústrias farmacêutica, de alimentos e bebidas, de detergentes e de biocombustíveis, enquanto outros setores como o de química fina, só recentemente vem considerando seu uso. Grande parte do sucesso da implementação de enzimas em processos industriais se deve aos avanços alcançados pelo desenvolvimento de novas tecnologias capazes de produzir enzimas a baixo custo e também em estabilizar e prolongar a vida útil destes biocatalisadores, tornando os processos mais atrativos economicamente. Assim, ressalta-se a importância da integração e transversalidade de áreas como a biotecnologia e a engenharia enzimática.

Atualmente, grande parte das enzimas industriais é proveniente de microrganismos, sejam elas nativas ou recombinantes. Assim, muitos trabalhos de prospecção têm sido conduzidos de forma a obter e isolar microrganismos produtores de enzimas de interesse (Adrio e Demain, 2014). As lipases se destacam nesse cenário por sua facilidade de obtenção e por sua versatilidade de usos, podendo ser aplicadas a processos nas indústrias de tratamento de efluentes, biorremediação, biocombustíveis, alimentos, cosméticos e aromas, farmacêutica, química fina, dentre outras.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Lipases

1.1 Visão geral

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas extremamente versáteis, classificadas na família das carboxil-éster hidrolases. Quando presentes em ambientes aquosos, catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, gerando ácidos graxos livres e glicerol como produtos de reação (Figura 1). Segundo Kapoor e Gupta (2012), a função de hidrólise representa o papel fisiológico destas enzimas no metabolismo de lipídeos, que ocorre em uma interface água/óleo.

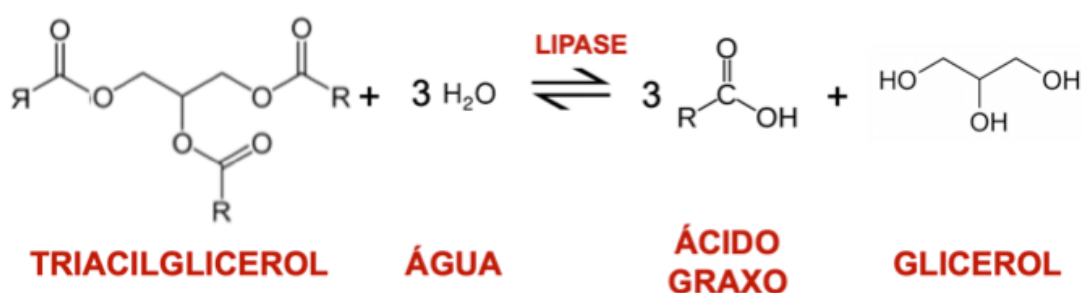


Figura 1. Reação de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipase.

Todavia, por sua especificidade relaxada, estas enzimas são capazes de catalisar uma série de outras reações, como a esterificação, a interesterificação e a transesterificação quando presentes em ambientes aquo-restritos (Figura 2). Tal característica é responsável pelo extenso leque de aplicações industriais destes biocatalisadores, sendo a classe de enzimas mais amplamente utilizada na síntese orgânica. De fato, preparações comerciais de lipases têm sido aplicadas em processos nas indústrias de alimentos, papel, detergentes, fármacos e cosméticos, tratamento de efluentes e também na produção de biodiesel (Mahapatra *et al.*, 2010; Toscano *et al.*, 2013).

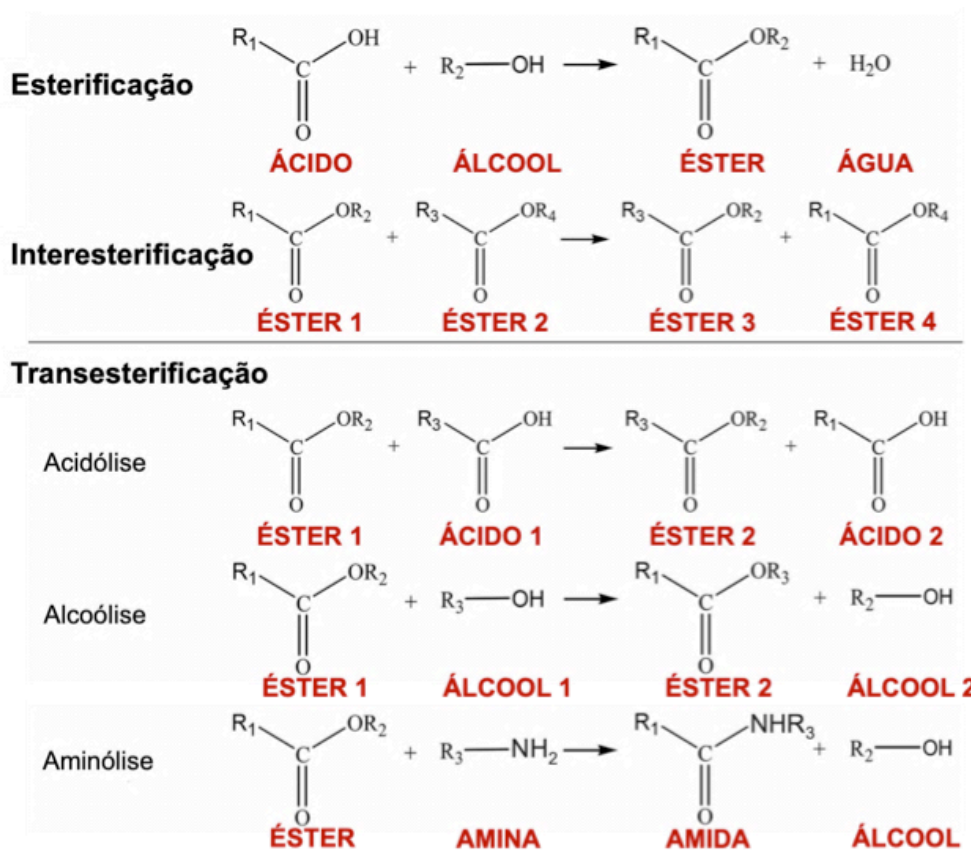


Figura 2. Reações catalisadas por lipases em ambientes aquo-restritos. Adaptado de Aouf *et al.*, 2014.

Além de uma extensa versatilidade catalítica, as lipases apresentam uma grande faixa de atuação em relação aos seus substratos. Assim, são capazes de atuar sobre lipídeos de diferentes características, como tipos de saturação e comprimentos de cadeia. Não obstante ao funcionamento destas enzimas em um amplo espectro de substratos, existem lipases que apresentam especificidades e preferências por certos substratos. Segundo Kapoor e Gupta (2012), a especificidade das lipases pode ser classificada em relação a três principais categorias:

1) ao posicionamento das cadeias de ácido graxo ligadas ao triacilglicerol. Algumas lipases apresentam uma preferência catalítica 1,3-específica, sendo capazes de catalisar reações, preferencialmente, nas posições 1 e 3 do triacilglicerol. Meghwanshi e colaboradores (2006), por exemplo, estudaram a regioespecificidade de lipases bacterianas, tendo

encontrado três isolados de *Bacillus* e um de *Pseudomonas* que produziram lipases 1,3-regioespecíficas, como determinado pela análise cromatográfica dos produtos de hidrólise da trioleína;

2) ao encaixe e posicionamento do substrato no sítio ativo da enzima. Este tipo de especificidade pode ser explicado pelas diferenças na estrutura terciária destas enzimas e o encaixe do substrato. Identificou-se que lipases com sítio de ligação ao substrato em formato de túnel apresentam maior aceitação a substratos com ácidos graxos de cadeia longa, enquanto que as lipases com um sítio de ligação em formato de fenda ou funil mostram preferência pelo oposto (Pleiss *et al.*, 1998); e

3) ao tipo de substrato, como o caso da lipase de *Geotrichum candidum*, que apresenta preferência pela hidrólise de ésteres constituídos de ácidos graxos de cadeia longa com ligações duplas entre o carbono 9 e o carbono 10 (Jensen, 1974).

Dentre outras classificações, as lipases se diferenciam das esterases por sua especificidade de atuação sobre o substrato de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do mesmo. Assim, consideram-se esterases as enzimas que são capazes de atuar apenas sobre triacilgliceróis de cadeia curta (solúveis em água) e lipases verdadeiras aquelas capazes de atuar tanto sobre triacilgliceróis de cadeia curta quanto longa (insolúveis em água) (Verger, 1997).

As lipases estão presentes nos genomas de todas as classes de organismos, sendo as de origem microbiana as mais utilizadas industrialmente devido à facilidade do cultivo dos microrganismos de forma rápida em meios simples e baratos, à facilidade de manipulação genética dos mesmos, às altas taxas de produção enzimática e à estabilidade destas enzimas (Mahapatra *et al.*, 2010; Dayanandan *et al.*, 2013).

1.2 Estrutura e mecanismo de reação

Apesar de serem observadas sequências de aminoácidos com baixa similaridade entre as enzimas lipolíticas, estas apresentam padrões típicos de dobramento e estrutura terciária. Neste sentido, as lipases podem ser

classificadas em três grupos distintos de acordo com seu padrão de dobramento. O primeiro e mais comum é o padrão conservado de dobramento das α/β -hidrolases. Outras lipases apresentam um padrão de dobra do tipo $\alpha/\beta/\alpha$, particular da família GDSL (nomeada a partir de um motivo conservado Gly-Asp-Ser-Leu) de enzimas lipolíticas, que caracteriza o segundo maior grupo. Por fim, algumas poucas lipases são caracterizadas por apresentar um padrão de dobramento do tipo β -lactamase (Kovacic *et al.*, 2019).

As α/β -hidrolases constituem uma superfamília de proteínas observadas em organismos representantes de todos os três domínios e relacionadas entre si por seu padrão de dobramento conservado. Esta superfamília representa um grupo diversificado e heterogêneo de proteínas, sendo composta em sua maioria por enzimas hidrolíticas, como proteases, peroxidases, epóxido hidrolases, dehalogenases, esterases e lipases. Entretanto, por apresentar o mesmo padrão de dobramento, algumas proteínas sem atividade catalítica também são incluídas nesta classificação, como as *neuroligins*, proteínas de adesão celular sináptica (Carr e Ollis, 2009). Segundo Ollis e colaboradores (1992), a existência de uma estrutura tridimensional tão conservada, mesmo em meio a tanta diversidade de funções biológicas, origem taxonômica e até de sequências primárias é promovida por proporcionar uma estabilidade e plasticidade estrutural capaz de abrigar diferentes tipos de atividades catalíticas, indicando uma vantagem evolutiva resultante de um processo de evolução convergente.

Apesar de apresentarem sequências de aminoácidos, funções biológicas e substratos de atuação bastante diversos, as lipases α/β -hidrolases compartilham similaridades de topologia e de sequências conservadas de resíduos de aminoácidos da tríade catalítica, bem como da organização e posicionamento de *loops* conservados responsáveis pela coordenação da tríade catalítica e pela formação do bolsão do oxianion. Sua tríade catalítica é tipicamente composta por resíduos de serina (Ser), ácido aspártico (Asp) ou ácido glutâmico (Glu) e histidina (His), frequentemente apresentados nesta ordem na sequência primária. O resíduo de serina é usualmente encontrado no pentapeptídeo conservado Glicina-X-Serina-X-Glicina, que no processo de enovelamento da enzima é responsável pela formação de um motivo estrutural

denominado de ombro nucleofílico, necessário para o posicionamento correto do resíduo de serina envolvido na catálise enzimática. Este motivo estrutural é considerado uma das estruturas mais conservadas e necessárias ao funcionamento das α/β -hidrolases (Ollis *et al.*, 1992).

O padrão de dobramento mais típico das lipases α/β -hidrolases consiste de um bolsão hidrofóbico central formado por oito cadeias de folhas beta coordenadas entre si em orientação paralela sendo a segunda cadeia usualmente disposta em orientação antiparalela. As cadeias de folhas beta são conectadas por meio de alfa-hélices que, em sua conformação final, aparecem cobrindo o bolsão hidrofóbico central para formar uma estrutura terciária globular estável (Figura 3) (Carr e Ollis, 2009). À estrutura canônica descrita, podem ser acrescentadas, ainda, motivos adicionais sem que o domínio α/β -hidrolase seja prejudicado. Outra característica estrutural usualmente encontrada se refere à presença de sítios conservados de ligação ao Ca^{2+} e de pontes dissulfeto que acreditam-se estar envolvidos na estabilização da conformação do centro ativo da enzima (El Khattabi, 2003).

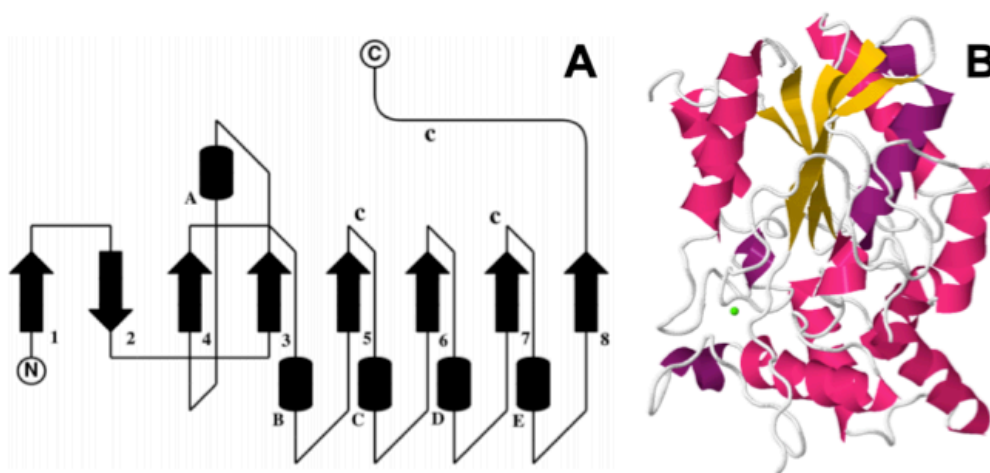


Figura 3. Estrutura das α/β -hidrolases. A: Estrutura canônica de dobramento das α/β -hidrolases (retirado de Carr e Ollis, 2009). B: Estrutura terciária resolvida do cristal da lipase de *Burkholderia glumae* exibindo em amarelo as cadeias beta e em rosa as alfa-hélices. Estrutura obtida do *Protein Data Bank* (PDB – 1QGE).

Observou-se que, quando presentes em uma solução com maior interface água/óleo, como em emulsões de substratos insolúveis ou uma solução micelar, a atividade lipolítica de algumas lipases era ampliada. A este fenômeno denominou-se ativação interfacial, um processo em que a enzima passa por uma série de mudanças conformacionais proporcionadas pela adsorção a substratos hidrofóbicos (Pandey *et al.*, 1999). Mais tarde, descobriu-se que, em um ambiente aquoso, as lipases se encontravam em equilíbrio entre duas formas estruturais diferentes (Figura 4). Na primeira delas, o sítio ativo da enzima é isolado do contato com o meio reacional, sendo na maioria dos casos separado por uma pequena cadeia oligopeptídica em formato de alfa-hélice denominada *Lid*, ou “tampa”. A esta estrutura, onde a lipase se encontra inativa, denominou-se conformação fechada. Na presença de uma superfície hidrofóbica, como as gotículas de óleo em uma emulsão, a enzima é adsorvida e adquire uma segunda forma estrutural, denominada conformação aberta, em que a “tampa” se desloca possibilitando a exposição do sítio ativo da enzima ao meio reacional (Cabrera *et al.*, 2009; Manoel *et al.*, 2015). Segundo Palomo e colaboradores (2002), a adsorção à superfície hidrofóbica é possibilitada não apenas pelas regiões do bolsão hidrofóbico ao redor do sítio ativo da enzima, mas também pela face interna da “tampa”, quando presente. Contudo, é importante destacar que a presença de uma estrutura de “tampa” não é universal e que, por vezes, mesmo contendo a estrutura de “tampa”, algumas lipases não exibem um comportamento de ativação interfacial, como é o caso da lipase de *Burkholderia glumae* (Kapoor e Gupta, 2012)

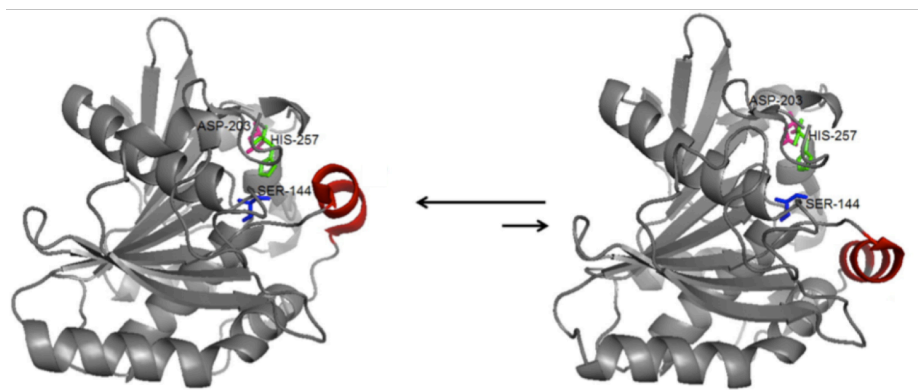


Figura 4. Equilíbrio das conformações fechada (à esquerda) e aberta (à direita) da lipase de *Rhizomucor miehei*. Retirado de Poppe *et al.*, 2015.

Após a etapa de adsorção da enzima ao substrato e acomodação deste nas regiões próximas ao sítio ativo, se inicia o processo de catálise enzimática. O mecanismo de reação para hidrólise de triacilgliceróis é exemplificado na Figura 5. Primeiramente, ocorre a ativação do resíduo de serina por meio da polarização do anel imidazólico do resíduo de histidina ocasionada pela orientação do resíduo ácido catalítico (Asp/Glu). A partir da ativação do resíduo de serina, este promove um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do substrato (Figura 5-1), que acarreta na formação de um intermediário tetraédrico transitório. Esta forma intermediária é estabilizada por ligações de hidrogênio entre o oxianion gerado e grupamentos carboxamida da cadeia principal de resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização do substrato e situados no bolsão do oxianion da enzima (Figura 5-2). Em seguida, por meio da doação de um próton do resíduo de histidina ao álcool correspondente (no caso da hidrólise de um monoacilglicerol, o álcool correspondente é uma molécula de glicerol), este é liberado e um complexo acil-lipase é formado (Figura 5-3). Por fim, uma molécula de água é ativada pelo resíduo de histidina e, então, o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do covalente intermediário, liberando o ácido graxo e proporcionando a regeneração da conformação inicial do sítio ativo da lipase (Figura 5-4) (Jaeger *et al.*, 1999).

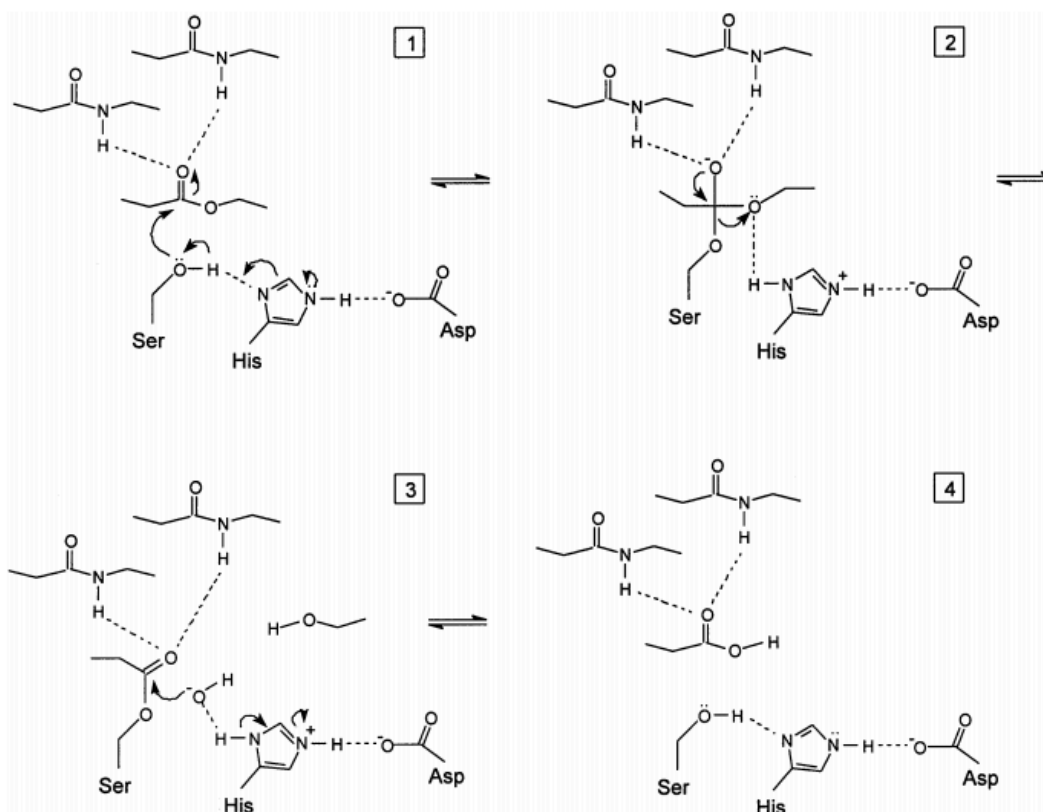


Figura 5. Mecanismo de reação proposto para a hidrólise de ésteres catalisada por lipases. Retirado de Jaeger *et al.*, 1999.

A família GDSL de enzimas lipolíticas, por sua vez, é caracterizada por um padrão de dobramento com um bolsão hidrofóbico conservado formado por cinco cadeias de folhas beta e quatro alfas-hélices, típico das $\alpha/\beta/\alpha$ -hidrolases. Diferente do padrão conservado das lipases α/β -hidrolases, nesta família o pentapeptídeo do ombro nucleofílico não é encontrado. Já os resíduos de aspartato e histidina, componentes da tríade catalítica, estão dispostos em um motivo D-X-X-H. Entretanto, apesar das diferenças estruturais, o mecanismo catalítico da lipases da família GDSL é semelhante ao mecanismo geral das α/β -hidrolases (Jaeger *et al.*, 1999), sendo capaz de hidrolisar um grupo diversificado e heterogêneo de substratos como glicoésteres, arilésteres, fosfolipídios e triacilgliceróis.

1.3 Classificação em famílias

Segundo o levantamento realizado por Kovacic e colaboradores (2019), foram identificadas e depositadas, até o momento, aproximadamente cinco mil

sequências de enzimas lipolíticas bacterianas. Deste total, menos de 10% já foi clonado, expresso e estudado de forma experimental.

Em uma tentativa de organizar e facilitar o acesso a este conhecimento, Kovacic e colaboradores (2019) propuseram a reclassificação das enzimas lipolíticas em famílias como forma complementar a um estudo iniciado pelo mesmo grupo de pesquisa vinte anos antes (Arpigny *et al.*, 1999). Ao total, as enzimas lipolíticas foram agrupadas em dezenove famílias a partir de critérios como filogenia, similaridade de sequências de aminoácidos, motivos estruturais conservados e funções biológicas.

De especial interesse biotecnológico por sua versatilidade de aplicações industriais, destacam-se as enzimas lipolíticas da família I, onde são agrupadas as lipases verdadeiras de origem bacteriana (Tabela1).

Tabela 1. Classificação das enzimas lipolíticas bacterianas da Família I. Adaptado de Kovacic *et al.*, 2019.

Subfamília	Origem	No. Acesso (UniProt ou PDB)
I.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P26876
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Q8RKT7
	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Q21T36
	<i>Vibrio cholerae</i>	P15493, A6A105, A5EYU1, A1F3S2, A3H0H8, A2PI47, A3EDG4, A3GSF6, A1EMR8, A2P8X1, A6AE39, A6XWR7, A2PS04, A3EIQ3
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	A6B1H2
	<i>Vibrio harveyi</i>	A6AS17
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	A0KFL9
	<i>Dehalococcoides</i> sp. VS	A8CY80
	<i>Chromobacterium violaceum</i>	Q7NUI4
	<i>Proteus mirabilis</i>	4GXN
	I.2	<i>Burkholderia glumae</i>
<i>Burkholderia cenocepacia</i>		Q1BM22, A0AZ26, B1K3P3
<i>Burkholderia multivorans</i>		Q45VN4, A9AMF2
<i>Burkholderia thailandensis</i>		Q2T7L1
<i>Pseudomonas KWI-56</i>		P25275
<i>Burkholderia cepacia</i>		P22088, Q4JL88, Q6B4I1, Q0BAH5
I.3	<i>Pseudomonas luteola</i>	O68551
	<i>Pseudomonas fluorescens PfO1</i>	Q3KCS9
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	P26504, P41773, Q76D26, Q76D27, Q76D28, Q76D29, Q76D31, Q76D32

	<i>Pseudomonas</i> sp. 7323	Q2KTB3
	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Q11BE9
	<i>Serratia proteamaculans</i>	A8GDX0
	<i>Serratia marcescens</i>	Q09KJ5, Q0MVP2, Q59932, Q59933
	Uncultured bacterium	A7J993
	<i>Psychrobacter</i> sp. PR-Wf-1	A5WGV1
	Uncultured bacterium	A0A0F7IH45
	<i>Pseudomonas</i> sp. MIS38	2Z8X
I.4	<i>Bacillus subtilis</i>	P37957
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	A7Z124
	<i>Bacillus pumilus</i>	A1E152, A8FGA4
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Q9K5F4
	<i>Bacillus</i> sp. NK13	B0LW76
	<i>Bacillus megaterium</i>	Q8RJP5
	<i>Bacillus clausii</i>	Q5WDN0
I.5	<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	Q59260
	<i>Geobacillus zalihae</i>	Q842J9
	<i>Bacillus</i> sp. L2	Q5I4I3
	<i>Geobacillus</i> sp. SF1	Q1L776
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	A0MTM1, O66015, Q93A71, Q9L6D3
	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Q5KYG5
	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	2W22
	<i>Geobacillus zalihae</i>	2DSN
I.6	<i>Staphylococcus hyicus</i>	P04635
	<i>Staphylococcus simulans</i>	Q84EK3
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Q2TPV1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	P0C0R3, Q9Z4M7, P0C0R4, Q5HKF8, Q5HKP6
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Q9RGZ6
	<i>Staphylococcus warneri</i>	Q5DWE2
	<i>Staphylococcus aureus</i>	P10335, Q59811, Q79SZ7, Q2YVD0, Q2YZ74, Q5HCM7, Q5HJ48, A6TYA4, A6U555, A5IP17, A5IW97, Q6GDD3, Q6GJZ6, Q6G604, Q6GCF1, P65288, Q99WQ6, Q8NUI5, Q8NYC2, P65289, Q7A7P2, Q2FUU5, Q2G155, A8YZE4, A8Z5H0, Q2FDJ1, Q2FJU4
I.7	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	O33969
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Q59644, Q6A6T8
	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Q8NU60, Q8NU59
	<i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	EAP97825
I.8	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Q3IF07
	<i>Hahella chejuensis</i>	Q2SGZ8
	<i>Colwellia psychrerythraea</i>	Q48AN1
	<i>Pseudoalteromonas tunicata</i>	A4CF12

A família I de enzimas lipolíticas é, por sua vez, subdividida em oito subfamílias, das quais as lipases de *Burkholderia* são agrupadas na subfamília I.2. As lipases pertencentes a esta subfamília distinguem-se por apresentar uma sequência de aminoácidos com alta similaridade à representante principal do grupo, a lipase de *Burkholderia glumae*. Segundo Kovacic e colaboradores (2019), tais enzimas apresentam duas folhas- β dispostas de forma antiparalela adicionais posicionadas em suas superfícies quando comparadas às enzimas da subfamília I.1 e, portanto, frequentemente, são descritas como tendo um tamanho de aproximadamente 36 kDa. Juntamente com *Pseudomonas*, as espécies de *Burkholderia* são distinguidas por sua eficiente produção e secreção de lipases. Quando associadas à espécimes vegetais, sua produção de lipases extracelulares pode estar associada a um contexto mutualístico, onde tanto a bactéria quanto a planta são beneficiadas. Por um lado, estas enzimas são utilizadas para hidrolisar triacilgliceróis presentes em sementes ou frutos oleaginosos a fim de obter ácidos graxos que podem ser utilizados para manutenção de estruturas celulares bacterianas ou serem destinados a um processo catabólico para obtenção de energia. Por outro lado, a ação lipolítica destas enzimas, juntamente com a ação de outras enzimas hidrolíticas secretadas, pode servir como um fator de patogenicidade, permitindo a invasão e destruição dos tecidos de invasores e contribuindo diretamente para uma atividade inseticida benéfica à planta (Kwak et al., 2015).

Os gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia* correspondem a bactérias Gram-negativas, grupo no qual a secreção de proteínas envolve uma série de etapas que possibilitam que a proteína atravesse duas membranas até alcançar o espaço extracelular, podendo ser feita por meio de seis tipos de sistemas de secreção distintos (Green e Mecsas, 2016). Para as lipases destes gêneros, foi demonstrada a dependência da co-expressão de uma foldase específica envolvida na etapa de dobra periplasmática da via do sistema de secreção do tipo II (Jaeger, 2002; Rosenau, 2004). Em termos de organização genômica, o gene *LIF*, que codifica para a foldase específica, é localizado adjacente (*downstream*) ao

gene *LIP*, que codifica para a lipase. A expressão geralmente ocorre por meio de um operon bicistrônico, podendo os genes estarem separados por uma região espaçadora ou até mesmo sobrepostos (Jørgensen *et al.*, 1991; Hobson *et al.*, 1993). Em um estudo realizado por Ogino e colaboradores (2013), foi demonstrado que a expressão da lipase de *P. aeruginosa* isoladamente resultou em uma enzima sem atividade catalítica. Entretanto, quando incubada *in vitro* com a foldase (expressa separadamente), a enzima apresentava atividade lipolítica. Deste modo, comprovou-se experimentalmente a dependência de *LIP* sobre *LIF*.

2. Prospecção de microrganismos produtores de lipase

A procura por novas e mais eficientes lipases está intrinsicamente relacionada à busca por microrganismos que produzam estas enzimas. Tais microrganismos podem ser encontrados associados a diversos ambientes ricos em lipídeos, como solos contaminados com óleo, sementes e frutos oleaginosos ou mesmo nos resíduos agroindustriais gerados no processo de extração de óleos e gorduras destes materiais. Assim, diversos trabalhos tem sido conduzidos a fim de isolar estes microrganismos produtores de lipase e avaliar sua atividade enzimática frente a uma aplicação de interesse (Ciudad *et al.*, 2011).

Usualmente, a avaliação da capacidade lipolítica de microrganismos tem sido executada através de testes qualitativos em meios seletivos, por meio da análise dos halos de hidrólise criados quando ocorre produção e secreção de lipases durante o crescimento. Estes halos podem ser visualizados devido a diferenças de opacidade do meio ou por meio do auxílio de corantes específicos, como é o caso dos ensaios com rodamina B. Este tipo de técnica tem sido amplamente utilizada graças à agilidade com que é realizada a avaliação de diversos isolados de forma concomitante, facilitando o trabalho de prospecção. Em uma próxima etapa de seleção, elegem-se alguns poucos isolados que tenham tido melhores resultados e estes são inoculados em meios de produção de lipases e, ao final do processo, têm suas atividades lipolíticas avaliadas por métodos quantitativos (Damaso *et al.*, 2013).

2.1 *Microrganismos associados ao dendzeiro*

O termo dendzeiro pode ser usado para se referir a duas espécies de plantas monocotiledôneas da família *Arecaceae* e do gênero *Elaeis*: o dendê africano *E. guineensis* (Jacq.) e o dendê americano *E. oleífera*. Devido a sua maior proporção de mesocarpo/fruto e conseqüente alto teor de óleo, a palmeira africana representa a maioria das variedades comerciais. Os frutos maduros de dendê são a fonte de dois tipos distintos de óleo. O óleo de palma é extraído do mesocarpo da fruta e é composto principalmente por ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1). O óleo de palmiste, alternativamente, é derivado da amêndoa do fruto e consiste principalmente de ácidos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) (Jones, 1989). Segundo Carter (2007), o óleo de palma corresponde por aproximadamente 30% da produção mundial de óleo vegetal, ultrapassando a soja como a mais importante cultura oleaginosa. Em termos de produtividade, o dendê também é considerado o maior produtor com registros de até 12 toneladas de óleo por hectare por ano (Perera, 2014).

A crescente demanda por volume de produção do óleo de palma é responsável pelo aumento da geração de resíduos associados à sua cadeia produtiva. De fato, segundo dados da Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas, no ano de 2017 foram produzidas $7,15 \cdot 10^7$ toneladas de óleo de palma, o que corresponde à geração de $2,46 \cdot 10^8$ toneladas de resíduos associados, representando um aumento de 64% apenas na última década (ONU, 2019). Atualmente, parte dos resíduos é aproveitada para geração de energia térmica e parte é reutilizado para adubagem das plantações. A utilização destes resíduos para a produção de enzimas representa uma destinação alternativa deste material, resultando em produtos de maior valor agregado dentro do contexto de bioeconomia circular em biorefinarias.

Devido à sua relevância comercial, o dendê tem sido objeto de diversos estudos relacionados à microbiota associados a seus frutos, folhas, raízes e até mesmo resíduos agroindustriais. As raízes do dendê, por exemplo, foram amplamente analisadas em estudos sobre o controle biológico de *Ganoderma boninense*, um basidiomiceto conhecido como agente patogênico para a

doença da podridão basal. A partir das rizosferas de dendezeiros já foram isoladas espécies de bactérias (tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus circulans*, *Variovorax* sp., *Lysobacter* sp. e *Serratia* sp.) e de fungos filamentosos (por exemplo, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. funiculosum*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. asperellum*, *T. virens*, *Gliocladium viride* e *Rhizopus* sp.) a fim de encontrar potenciais candidatos ao controle do patógeno *G. boninense* (Susanto, 2005; Sapak, 2008; Liew, 2009; Bivi, 2010; Sundram, 2013; Zainudin, 2017). Outras espécies de fungos, como *Marasmiellus palmivorus* e *Thielaviopsis paradoxa*, também foram relatadas como patogênicos para dendezeiros (Pong, 2012; Li, 2018). Além da microbiota nativa, a introdução de microorganismos externos, tais como *Bacillus thuringiensis*, em rotação com os tratamentos utilizando inseticida (Rynaxypyr) provou ser eficaz contra ataques da mariposa *Tirathaba rufivena* em culturas de óleo de palma sem interferir com a população do polinizador *Elaeidobius kamerunicus* (Prasetyo, 2018).

Além de funcionar como antagonistas ou auxiliar na luta contra patógenos, alguns microrganismos também têm sido relatados como parceiros mutualísticos com o dendezeiro, ajudando na nutrição da planta. Um estudo descobriu que as rizobactérias *Pseudomonas fluorescens* são capazes de solubilizar o fosfato e torná-lo assimilável pela palmeira, tornando-o um potencial biofertilizante (Fankem, 2006).

Considerando que são ambientes ricos em lipídeos, tanto os frutos do dendezeiro quanto os resíduos derivados da cadeia produtiva de obtenção do óleo de palma são substratos propícios a encontrar microrganismos produtores de lipases. Contudo, poucos estudos têm explorado o potencial de prospecção de enzimas a partir de microrganismos associados a esta planta. Até o momento, foram publicados apenas dois estudos sobre o tema. Um estudo de prospecção de microrganismos celulolíticos associados ao cacho de dendê vazio (Bakar, 2010) e um estudo que demonstrou que fungos filamentosos isolados de frutos de dendê podem causar acidificação de óleos vegetais devido à hidrólise dos triacilgliceróis, o que indicaria a produção de

lipases (Eggins, 1964). Os seguintes fungos foram encontrados: *Choanephora* sp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Trichoderma viride*, *Aspergillus* sp., *A. niger*, *A. tamarii*, *A. giganteus*, *A. luchuensis*, *A. candidus*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium* spp. , *Phycomyces* sp., *Paecilomyces varioti*, *Cunninghamella elegans* e *Neurospora sitophila*. Entretanto, o potencial de produção de lipases por estes microrganismos não foi explorado.

3. Produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES)

Entende-se por fermentação em estado sólido (FES) o cultivo de microrganismos em substratos sólidos sem a presença de água livre (Fraga *et al.*, 2012). Estes substratos sólidos podem funcionar tanto apenas como suporte para o crescimento quanto como fonte de nutrientes para o microrganismo.

Tradicionalmente, este tipo de cultivo está associado ao uso de resíduos agroindustriais como suporte sólido, sendo o farelo de trigo o mais frequente na literatura (Toscano *et al.*, 2013). O aproveitamento de resíduos agroindustriais como suporte sólido para fermentação não só simula condições naturais de crescimento dos microrganismos como também tem sido visto como um excelente modo de reduzir os custos associados à produção de enzimas. Isso porque tratam-se de materiais abundantes e baratos, satisfazendo a crescente demanda industrial. Assim, o aproveitamento de resíduos agroindustriais somado à obtenção de produtos de maior valor agregado caracteriza aspectos da biorefinaria em um contexto de bioeconomia circular de baixo carbono (Silva *et al.*, 2017).

Quando comparada à fermentação submersa (modo de cultivo mais utilizado pela indústria), a FES pode apresentar maiores rendimentos e produtos de maior qualidade, como enzimas mais concentradas e com maior estabilidade a diferentes valores de pH e temperaturas (Mahapatra *et al.*, 2010; Malilas *et al.*, 2013). Outra vantagem da utilização desta forma de cultivo é que as enzimas produzidas muitas das vezes permanecem adsorvidas ao substrato, fazendo com que o sólido fermentado (material resultante do cultivo) funcione como uma espécie de suporte para a “imobilização” das enzimas produzidas. Em um estudo econômico da produção de lipases realizado por

Castilho e colaboradores (2000), a produção por fermentação submersa necessitou de um investimento 78% maior do que a por FES, sendo os custos de produto unitários desta última 47% mais baixos do que o preço de mercado de lipase, indicando que o processo é atraente do ponto de vista econômico.

Um levantamento da produção de lipases microbianas por FES é apresentado no Anexo I.

3.1 Substratos e suportes

Dentre os diversos tipos de substratos utilizados para o cultivo de microrganismos por FES, os resíduos agroindustriais são os mais utilizados como indutores da produção de lipases. Sejam cascas, farelos, tortas resultantes da prensa para obtenção de óleo ou mesmo grãos completos, o uso de substratos vegetais é visivelmente a forma mais comum de produzir lipases por meios microbianos. No entanto, alguns grupos de pesquisa já buscaram analisar o potencial de substratos menos convencionais, como substratos de origem animal. É o caso do estudo realizado por Esakkiraj e colaboradores (2012), que obtiveram esterases halofílicas a partir da fermentação por *Bacillus altitudinis* de vários subprodutos da indústria de processamento de pescado, demonstrando assim a necessidade de prospecção de novos substratos adequados para a FES.

Como resíduos diretos obtidos após a extração de óleo, as tortas (ou fibras de prensagem) são ambientes ricos em óleo residual que sustentam o crescimento de microrganismos produtores de lipases. Neste sentido, a indução da produção de lipases extracelulares na presença de substratos lipídicos tem sido amplamente relatada na literatura (Christakopoulos *et al.*, 1998; Mahadik *et al.*, 2002; Falony *et al.*, 2006; Rigo *et al.*, 2010).

Muitas foram as tortas e resíduos associados à produção de óleos vegetais que foram avaliados como suportes para a produção de lipases por FES, como a torta de oliva (Cordova *et al.*, 1998; Moftah *et al.*, 2012; Moftah *et al.*, 2013; Sahoo *et al.*, 2014), a torta de gergelim (Kamini *et al.*, 1998; Sandana-Mala *et al.*, 2007; Dayanandan *et al.*, 2013), a torta de babaçu (Gombert *et al.*, 1999; Castilho *et al.*, 2000; Palma *et al.*, 2000; Leal *et al.*, 2002;

Cavalcanti *et al.*, 2005; Gutarra *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2006; de Azeredo *et al.*, 2007; Gutarra *et al.*, 2007; Valladão *et al.*, 2007; Damasceno *et al.*, 2008; Rigo *et al.*, 2008a; Rigo *et al.*, 2008b; Cunha *et al.*, 2009; Gutarra *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2010; Valente *et al.*, 2010; Alexandre *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011a; Silva *et al.*, 2011b; Valladão *et al.*, 2011a; Valladão *et al.*, 2011b; Damasceno *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014), a torta de coco (Benjamin e Pandey, 2001; Khoramnia *et al.*, 2011), a torta de soja (di Luccio *et al.*, 2004), a torta de mamona e outros resíduos associados (Silva *et al.*, 2011b; Godoy *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2011), a torta de canola (Amin *et al.*, 2011; Rehman *et al.*, 2011; Bhatti *et al.*, 2013; Amin *et al.*, 2014), a torta de mostarda (Imandi *et al.*, 2013; Sethi *et al.*, 2013), a farinha de sementes de crambe (Oliveira *et al.*, 2013), a torta de pinhão-manso (Mahanta *et al.*, 2008; Kuhn *et al.*, 2010; Veerabhadrapa *et al.*, 2014), a torta das sementes de *Pongamia* sp. (Sangeetha *et al.*, 2011) e a torta de nim (Sethi *et al.*, 2013). O cultivo desses microrganismos nestes substratos não é apenas atraente para a produção de lipases, mas em alguns casos também desempenha um papel crítico na destoxificação de alguns substratos, como nos casos das tortas de mamona e de pinhão-manso. Esta tem sido uma estratégia interessante que resulta na possibilidade de destinar os sólidos fermentados obtidos a outros fins, como o uso para ração animal, o que acaba por agregar valor econômico a esses resíduos agrícolas (Godoy *et al.*, 2009; Veerabhadrapa *et al.*, 2014).

Embora os substratos orgânicos sejam os mais convencionais, estes não são os únicos utilizados para a produção de lipases microbianas por FES. Substratos inorgânicos, por vezes denominados de sintéticos ou inertes, como a perlita ou mesmo algumas resinas aniônicas, foram testados com sucesso como suportes para a produção de lipases (Christen *et al.*, 1995; Martínez-Ruiz *et al.*, 2008; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009). Diferentemente dos substratos orgânicos, onde para o cultivo de alguns microrganismos por FES pode ser realizado apenas pela adição de água ao substrato, o uso de substratos inertes deve incluir a suplementação de um meio de cultura para permitir o crescimento microbiano e estimular a produção e a secreção de enzimas. O estudo publicado por López e colaboradores (2010) lista que triacilgliceróis, ácidos graxos, alcanos, álcoois e perfluorcarbonos têm sido relatados na

literatura como indutores da produção de lipases. Por exemplo, o trabalho de Domínguez e colaboradores (2003) comparou a produção de lipases de *Yarrowia lipolytica* sob crescimento em castanhas trituradas e esponja de náilon e o trabalho de López e colaboradores (2010) comparou a produção de lipases de *Rhizopus oryzae* sob crescimento em farelo de cevada e esponja de náilon. Ambos os estudos concluíram que o uso de suportes orgânicos aumentou a atividade lipolítica em quase 5 vezes quando comparado com as mesmas condições usando suportes inertes umedecidos com meios orgânicos.

A respeito da relação entre a FES e o substrato de escolha, é interessante destacar que neste tipo de cultivo os microrganismos não crescem apenas na superfície dos suportes sólidos ou próximo às partículas deles. Todavia, associam-se a eles, acessando tanto os espaços intercelulares quanto intracelulares dos substratos em questão (López *et al.*, 2010). Essa característica não apenas aproxima o cultivo ao ambiente natural do microrganismo e torna o processo muito mais eficiente, como também constitui uma vantagem econômica significativa, já que o sistema de microrganismos-substratos (sólidos fermentados) pode ser facilmente removido e aplicado a outro processo, como no caso da utilização de sólidos fermentados para a produção de biodiesel (Salum *et al.*, 2010).

3.2 Temperatura de cultivo

A temperatura de um cultivo é um fator de extrema importância quando se considera um processo por FES, podendo influenciar tanto no crescimento e desenvolvimento do microrganismo quanto na produção das lipases. A temperatura deve ser considerada não só com relação à classificação do microrganismo em relação ao seu crescimento ótimo, mas também por estar intrinsecamente relacionada ao processo de transferência de calor em um cultivo por FES. Segundo Bhargav e colaboradores (2008), os suportes usualmente utilizados para cultivo por FES apresentam uma baixa condutividade térmica, sendo difícil a dissipação do calor produzido por meio do metabolismo do microrganismo durante o cultivo e fazendo com que este se acumule. Outro fator fundamental a ser considerado é a formação de gradientes de temperatura. O desenvolvimento destes microclimas de

temperatura pode impactar negativamente a produção das enzimas e até a repetibilidade dos cultivos, já que a homogeneidade do cultivo fica comprometida (Kapilan, 2015; Soccol *et al.*, 2017). Para contornar este efeito, deve-se considerar o tipo de reator, a forma como o substrato estará disposto, bem como a espessura do leito e até o tamanho da partícula do substrato. Substratos com maior granulometria tendem a acumular mais ar no espaço interparticular do leito, o que acaba por ser benéfico em quesitos como aeração, mas dificulta ainda mais a questão da transferência de calor. Em relação à umidade, também deve ser considerado que um aumento na quantidade de água do cultivo reflete em um aumento da condutividade térmica. Entretanto, como será discutido no item 3.3, um aumento no teor de umidade acompanha uma série de consequências que devem ser balanceadas.

3.3 Umidade e tamanho da partícula

A ausência de água livre para que o cultivo seja considerado uma FES não significa carência hídrica. Contudo, pode-se afirmar que o cultivo por FES implica em um consumo de menores quantidades de água, sendo esta uma das vantagens da FES em relação à fermentação submersa. Vários pesquisadores relataram a influência do teor de umidade nas propriedades físicas do substrato, sendo este um fator crítico para o cultivo por FES.

Um alto teor de água na composição do meio pode levar a uma diminuição na porosidade do substrato, ao desenvolvimento de viscosidade, à baixa transferência de oxigênio e redução de trocas gasosas, o estímulo à formação de micélio aéreo ou colonização superficial e à alteração da estrutura da partícula do substrato. Por outro lado, o baixo teor de água também pode levar a vários problemas, como baixa solubilidade de nutrientes, maior tensão de água e turgidez incompatível com o cultivo. Godoy (2011) e Moftah (2012), por exemplo, observaram que baixas umidades resultam em menor turgescência do substrato, o que pode reduzir a acessibilidade de nutrientes pelo microrganismo, resultando em menor crescimento e produção de enzimas e metabólitos.

Em relação ao tamanho das partículas do substrato, tem-se que quanto maior a granulometria do material que compõe o substrato, menor a compactação do suporte e maior a aeração, possibilitando amplo acesso do microrganismo aos espaços intercelulares e intracelulares do substrato. Contudo, observa-se também uma menor atividade de água, já que o aumento dos espaços entre as partículas é responsável por aumentar a tensão superficial da água presente. Entretanto, buscando acrescentar uma maior quantidade de água para que esta seja capaz de envolver todo o material, é possível que esta acabe por se acumular em porções de água livre, o que descaracterizaria o cultivo por FES. Por outro lado, um cultivo que se utiliza de partículas menores pode resultar em um ambiente com maior compactação do suporte, porosidade reduzida e menor aeração, dificultando o acesso e a colonização completa do substrato pelo microrganismo. Todavia, uma menor granulometria pode estar associada a um aumento da superfície de contato do substrato e uma maior atividade água.

Deste modo, quando se trata de simular um ambiente natural para o crescimento de microrganismos, faz-se necessário avaliar e equilibrar a relação entre as proporções de tamanho das partículas do substrato, a quantidade de água utilizada e a preferência do microrganismo por cada tipo de ambiente.

4. Imobilização e estabilização de lipases

A imobilização de uma enzima pode ser definida como um processo que promove a sua fixação a um suporte (ou matriz) insolúvel no meio reacional de forma que estas fiquem restritas a uma fase sólida por onde os substratos e produtos da reação possam circular livremente sem que sejam retidos junto à enzima. A grande vantagem de imobilizar uma enzima reside no fato de que este processo pode promover um aumento da estabilidade destes biocatalisadores sob as condições de reação. Ademais, devido à característica heterogênea da mistura (distinta do uso das enzimas em sua forma livre), possibilita-se a fácil recuperação e reutilização destes biocatalisadores em sucessivos ciclos que resultam em produtos de maior pureza. Dessa forma, o reaproveitamento destes biocatalisadores é capaz de promover um

melhoramento de sua performance quando aplicados a situações de uso industrial (Fernandez-Lafuente et al., 1998; Zdarta et al., 2018).

Diversos materiais podem ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas e podem ser classificados em duas grandes categorias: suportes inorgânicos e orgânicos. Suportes inorgânicos são conhecidos por apresentarem características interessantes como rigidez, porosidade e resistência à microrganismos. Alguns exemplos deste tipo de suporte são vidros, cerâmicas, óxidos metálicos, sílicas, entre outros. Os suportes orgânicos podem ser subdivididos em polímeros sintéticos (normalmente resinas insolúveis em água, de superfície porosa e resistentes ao ataque de microrganismos) e biopolímeros (materiais renováveis obtidos de fontes naturais disponíveis em grande quantidade e com baixo custo; normalmente são insolúveis em água e capazes de formar géis inertes). Alguns exemplos de polímeros orgânicos sintéticos são poliestirenos, poliamidas, PVC e DEAE celulose. Alguns dos polímeros orgânicos naturais que se destacam por sua extensa aplicação são alginatos, quitosanas, celulosas e sefaroses (Sirisha et al., 2016; Zdarta et al., 2018).

Idealmente, os materiais de composição dos suportes utilizados para imobilização de enzimas devem apresentar uma série de propriedades desejáveis como ser de baixo custo, ser estável, insolúvel e inerte no meio reacional, apresentar resistência mecânica, térmica e a diferentes solventes e valores de pH, ser capaz de ser regenerado após o uso, apresentar grupos funcionais reativos com a enzima a ser imobilizada e ser capaz de acomodar grandes quantidades de enzima. O suporte deve, também, ser capaz de proteger a estrutura da enzima contra condições severas e, assim, ajudar a enzima imobilizada a manter uma alta atividade catalítica. A escolha por um material ou outro deve levar em consideração quais características devem ser priorizadas dadas as suas peculiaridades de uso na aplicação em questão.

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser classificados de acordo com o tipo e a forma de interação entre a enzima e o suporte (Figura 6):

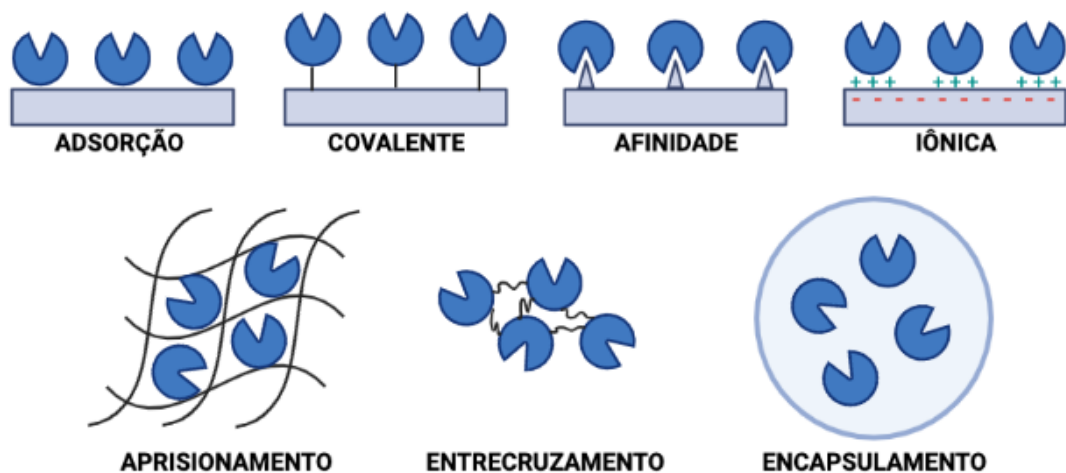


Figura 6. Estratégias de imobilização de enzimas.

- I. Adsorção física: neste método as enzimas permanecem aderidas superficialmente ao suporte por meio de interações hidrofóbicas, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e/ou da formação de interações eletrostáticas entre a enzima e a matriz de suporte. Uma vantagem deste tipo de imobilização está no fato de que as enzimas normalmente conservam suas estruturas nativas, o que acaba por promover a manutenção de suas atividades catalíticas. É um processo reversível, já que após a perda de atividade da enzima, esta pode ser desorvida e o suporte regenerado e aplicado a uma nova etapa de imobilização (Jesionowski et al., 2014; Sirisha et al., 2016);
- II. Ligação covalente: é induzida a formação de uma ou mais ligações covalentes entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos eletricamente carregados presentes na superfície da enzima e os grupos funcionais reativos da matriz de suporte. Trata-se de uma estratégia que previne a desorção da enzima no meio reacional e a consequente perda de atividade catalítica por desorção ao longo dos ciclos de reuso. Entretanto, uma desvantagem é que a perda de atividade enzimática resulta no descarte do suporte, pois este não pode ser regenerado nem reaproveitado. Ademais, dependendo da forma

como a enzima se ligar ao suporte, as mudanças conformacionais ocasionadas podem acarretar em perdas de atividade e/ou estabilidade do biocatalisador (Mateo et al., 2007; Sheldon e van Pelt, 2013);

- III. Entrecruzamento ou Cross-linking: neste método de imobilização as enzimas são covalentemente conectadas entre si por ligações cruzadas entre os grupos amino expostos na superfície da enzima através da ação de um agente reticulante, o que acaba por formar uma rede tridimensional complexa. Assim, não há a necessidade de um suporte, o que acaba por ser uma vantagem deste método. Nos tipos de imobilização em que se faz necessário o uso de um suporte, este representa grande parte da massa total (de 90 a 99%) que não tem atividade catalítica. As partículas formadas pelo entrecruzamento das enzimas podem assumir uma forma de cristal (CLEC) ou de agregado (CLEA), sendo este último uma forma de combinar etapas de purificação e imobilização (Sheldon, 2011);
- IV. Afinidade: método em que a afinidade da enzima pelo suporte dadas condições específicas que favoreçam esta interação é utilizada para assegurar que esta se mantenha aderida à matriz de suporte. A grande vantagem deste tipo de imobilização está no fato de que é possível combinar etapas de purificação e imobilização em um passo único e com alta eficiência de imobilização (Bastida et al., 1998);
- V. Interação iônica: neste método a enzima é retida no suporte pela interação iônica das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos da enzima com trocadores iônicos de carga oposta em condições de força iônica, pH, polaridade e temperatura específicas que viabilizem a manutenção destas interações não covalentes (Sirisha et al., 2016);
- VI. Aprisionamento: a enzima é enclausurada no interior de uma rede polimérica que retém a enzima mas permite a passagem de substratos e produtos. Neste tipo de imobilização a síntese do suporte ocorre na presença da enzima, que permanece em solução, mas com movimentos restritos ao interior da rede formada (Cardoso et al., 2009);

VII. Encapsulamento: as enzimas são incluídas em micelas delimitadas por uma membrana semipermeável que permite o movimento de substratos e produtos, mas contém as enzimas sempre em seu interior. Ao contrário do caso em que a enzima é aprisionada em uma rede polimérica, quando encapsulada ela pode se mover quase que livremente dentro do interior da micela. Em alguns casos, a interação da enzima com o material componente da membrana pode até favorecer uma manutenção e aumento da atividade catalítica. De fato, Macario e colaboradores (2009) verificaram que uma lipase encapsulada manteve seu centro catalítico ativado pelos grupos hidrofóbicos do surfactante, o que resultou em uma enzima imobilizada mais ativa que em sua forma livre.

Para que todo o potencial catalítico de uma enzima possa ser explorado, é imprescindível que estas apresentem estabilidade nos meios reacionais apropriados para cada processo e, principalmente, que possam ser reutilizadas, reduzindo os custos associados. A estabilização de enzimas industriais é um dos principais desafios da engenharia enzimática e pode ser alcançada por meio da imobilização destes biocatalisadores. Para as lipases, tem-se estabelecido com frequência estratégias de imobilização como a ligação covalente multipontual e a adsorção interfacial. No entanto, nesses casos, a maior parte da superfície da enzima não permanece em contato com o suporte, podendo ser alvo de novas estratégias de estabilização, como técnicas de entrecruzamento com polímeros policatiônicos e de alta viscosidade. A estabilização eficiente destas enzimas permite a sua reutilização por mais ciclos de uso, preservando sua atividade e seletividade por longos períodos de tempo, reduzindo os custos associados à utilização destas enzimas e viabilizando sua aplicação industrial.

5. Lipases na produção de biocombustíveis

5.1 Biodiesel

A crescente preocupação ambiental com a emissão de gases de efeito estufa e a limitação finita dos combustíveis fósseis revelou a necessidade da busca por fontes de energia renováveis. Assim, os biocombustíveis surgem

como tecnologias alternativas mais sustentáveis e eficientes que visam tanto baixos impactos ambientais quanto benefícios econômicos.

O biodiesel é um combustível líquido composto por uma mistura de mono-alquil ésteres, formados em sua grande maioria por reações de transesterificação. A reação consiste na utilização de triacilgliceróis (oriundos de fontes diversas, como óleos vegetais, gorduras animais ou até óleos de fritura usados) e álcoois de cadeia curta, sendo o metanol o mais comum (Salum *et al.*, 2010; Malilas *et al.*, 2013). Assim, tradicionalmente tanto ésteres metílicos (FAME) quanto ésteres etílicos (FAEE) podem ser considerados biodiesel, sendo os FAME mais abundantes em um contexto de catálise química alcalina. Além do menor custo, algumas das vantagens do uso do metanol em detrimento do etanol são sua maior reatividade e rendimento final da reação e também maior facilidade de separação da fase de glicerol obtida ao final do processo. Entretanto, o metanol não é o álcool mais adequado ao processo, devido não só a sua toxicidade, mas também por ser um composto de origem fóssil, o que acaba por comprometer o viés sustentável do biodiesel como combustível “verde” (Sun *et al.*, 2009). Ademais, no contexto brasileiro, a preferência por uma rota etílica é coerente, já que o país se destaca como um dos principais produtores de etanol (Soares *et al.*, 2013).

Diferencia-se do diesel convencional tanto por sua origem quanto por sua composição química (Figura 7). Enquanto o diesel convencional é um derivado do fracionamento do petróleo, o biodiesel é originado a partir de recursos renováveis, como óleos vegetais e gorduras animais. Com relação à sua composição química, o diesel convencional é constituído da mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa. Em contrapartida, o biodiesel é definido como uma mistura de ésteres de ácidos graxos e, portanto, exhibe propriedades químicas diferentes, como maior teor de oxigênio e menor densidade energética.

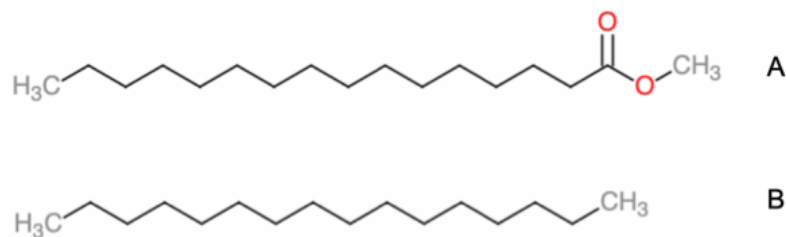


Figura 7. Exemplo de moléculas que compõem o biodiesel e o diesel convencional. O biodiesel é formado por ésteres de ácidos graxos (A) e o diesel convencional é constituído de hidrocarbonetos de origem fóssil (B).

O biodiesel pode ser comercializado na sua forma pura (B100) ou em forma de *blend*, sendo misturado ao diesel convencional de origem fóssil. Segundo o órgão americano *Alternative Fuels Data Center* (Estados Unidos da América, 2008), os *blends* de até B20 (referente à adição de 20% de biodiesel ao diesel convencional) ou menores podem ser usados para abastecer motores de combustão interna a diesel sem que sejam necessárias modificações e sem prejuízo ao sistema do equipamento. Para o uso do biodiesel em sua forma pura (B100), entretanto, algumas modificações no motor podem ser exigidas de modo que sejam evitados problemas de manutenção ou de desempenho.

Assim, a produção de biodiesel e de seus *blends* correspondentes tem sido estimulada por políticas de governo de incentivo ao uso deste biocombustível com a estipulação de um mínimo de mistura obrigatória. Estas políticas de governo já foram implementadas em diversos países da Europa, nos Estados Unidos da América e também no Brasil. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, a forma mais encontrada e comercializada é a correspondente ao *blend* B20 (Estados Unidos da América, 2008).

No Brasil, o cenário começou a se desenvolver no ano de 2004 com a instituição do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), sendo comercializado, com caráter facultativo de adição, o primeiro *blend* (B2) no ano de 2005. Já em 2008, foi implementada a obrigatoriedade da comercialização do diesel em todo território nacional com a mistura de 2%, sendo, ainda, instituídas metas de incremento deste percentual, atingindo em 2018 um percentual obrigatório de adição em 10% (Brasil, 2016). No final de

2018, instituiu-se pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) o novo cronograma de evolução do *blend* de biodiesel comercializado de B10 (atual) até B15, que deve ser atingido em 2023 com um incremento de 1% ao ano (Figura 8). A partir de março de 2021, a obrigatoriedade da comercialização de B13 já foi estabelecida (Brasil, 2018). Assim, é enfatizada a importância do estudo e da produção deste biocombustível de forma cada vez mais sustentável.

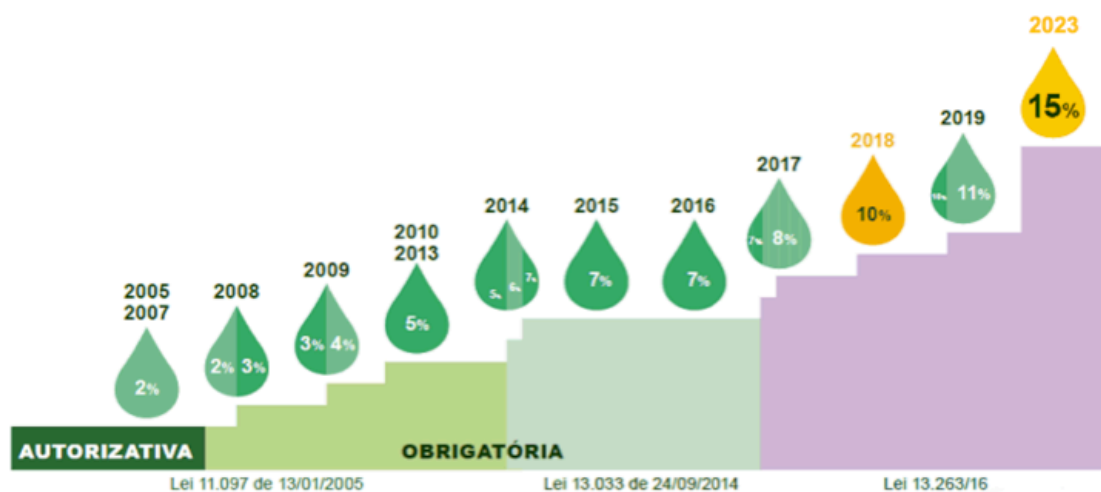


Figura 8. Evolução da mistura de biodiesel no Brasil de acordo com o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB). Retirado de ubrabiio.com.br/pnpb.

A implementação da obrigatoriedade da utilização do biodiesel vai além de uma motivação simplesmente tecnológica ou uma questão de estímulo da competitividade no mercado. Ela carrega em sua fundamentação um fortalecimento de todos os aspectos da cadeia produtiva, tais como geração de empregos e renda, atração de investimentos e de capital para a indústria além de benefícios ambientais inerentes ao uso deste biocombustível, como a redução das emissões de gases de efeito estufa.

No contexto do Distrito Federal, algumas medidas de estímulo à utilização deste biocombustível têm sido implementadas. A partir de janeiro de 2017 uma frota de ônibus passou a circular na região central da capital sendo

abastecida com um *blend* B20, correspondente a um teor acima do mínimo exigido por lei hoje em território nacional.

5.2 Síntese enzimática de biodiesel

Atualmente, o processo mais empregado para a produção do biodiesel é o de catálise alcalina, por meio do uso de hidróxido de sódio (NaOH) ou de hidróxido de potássio (KOH). Algumas das vantagens da utilização deste processo químico são o baixo custo dos catalisadores, o curto tempo de reação e as altas taxas de rendimento obtidas. Contudo, este processo pode ser considerado dispendioso em questões como o consumo de energia e água. Em relação ao impacto ambiental, a utilização do processo alcalino é responsável pela geração de uma grande quantidade de efluentes, decorrentes da lavagem do biodiesel produzido, de modo que seja retirado todo resquício do catalisador (que pode ser prejudicial ao funcionamento dos motores de combustão interna). Além disso, o glicerol originado deste processo é de baixa qualidade e de difícil recuperação, devido à alcalinidade promovida pela presença elevada do catalisador. No que se refere aos substratos da reação, a utilização de óleos de menor qualidade e maior acidez (maior quantidade de ácidos graxos livres), como é o caso dos óleos de palma, de macaúba e de óleos de fritura usados, não é recomendada para a síntese de biodiesel por meio do processo alcalino. Quando utilizados como substrato para este processo químico, ocorre a saponificação dos ácidos graxos livres, dificultando a separação do biodiesel e reduzindo o rendimento do processo.

Em contrapartida, o processo de produção de biodiesel por catálise enzimática apresenta menor consumo de água em etapas de lavagem, resultando em baixo impacto ambiental. Além disso, produz um glicerol de alta qualidade e de fácil recuperação, consome menos energia e é capaz de formar mono-alquil ésteres tanto a partir de triacilgliceróis quanto de ácidos graxos livres, tornando-o mais atrativo para o uso com matérias primas de baixo valor agregado, como os óleos ácidos (Salum *et al.*, 2013). Todavia, a obtenção do catalisador ainda apresenta um elevado custo, sendo este um dos grandes obstáculos à consolidação deste processo pela indústria (Liu *et al.*, 2013; Liu *et*

al., 2014). A Tabela 2 apresenta uma comparação entre os processos enzimático e alcalino para a produção de biodiesel.

Tabela 2. Comparação entre o processo enzimático e o processo alcalino convencional para a produção de biodiesel. Retirado de Salum *et al.*, 2013.

Problema	Processo Enzimático	Processo Alcalino
Ácidos graxos livres no óleo	Ácidos graxos livres são esterificados	Ácidos graxos livres são transformados em sabão
Pequenas quantidades de água no meio reacional	Não prejudica a atuação da lipase	Pode hidrolisar o óleo, formando sabão
Conversão em biodiesel	Alta, geralmente em torno de 90%	Alta, geralmente maior do que 96%
Recuperação do glicerol	Fácil, glicerol de alta qualidade	Complexa, glicerol de baixa qualidade
Recuperação e reutilização do catalisador	Fácil	Difícil ou inviável
Consumo de energia	Baixo, temperatura de reação entre 20-50 °C	Médio, temperatura de reação entre 60-80 °C
Custo do catalisador	Alto	Baixo
Impacto ambiental	baixo	Médio, grande quantidade de efluentes gerada

Uma das formas de tentativa de redução dos custos e viabilização do processo enzimático está no uso de formas imobilizadas destas enzimas (Tan *et al.*, 2010). De fato, em um estudo econômico de comparação entre o uso de enzimas imobilizadas e o uso de sua forma livre, o custo associado ao processo de produção do biodiesel a partir de lipases solúveis foi de 3,2 vezes mais alto do que a utilização da forma imobilizada (Jegannathan *et al.*, 2011). O maior custo na produção do biodiesel por catálise enzimática, em relação ao processo alcalino, se deveu ao maior custo da enzima e ao maior tempo de reação do processo enzimático. Contudo, a possibilidade de reutilização da

enzima imobilizada foi responsável pela drástica redução do custo de produção de biodiesel em relação ao processo no qual utilizou-se a lipase solúvel.

Uma forma de viabilizar este processo e ainda reduzir as etapas associadas à imobilização de uma enzima, como a extração, purificação e imobilização em si, seria o uso dos próprios sólidos fermentados obtidos de um cultivo por fermentação em estado sólido como biocatalisadores da reação de transesterificação (Liu *et al.*, 2014). Outra vantagem do uso de sólidos fermentados é, ainda, a associação da produção destes com a utilização de resíduos agroindustriais, reduzindo ainda mais os custos associados ao processo e agregando valor a um resíduo outrora desprezado (Salum *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013).

Deste modo, torna-se necessária a busca por novos microrganismos produtores de lipases, bem como por melhoramentos nos processos de obtenção e estabilização destas enzimas, de modo que novas lipases mais eficientes possam ser empregadas, reduzindo, assim, custos associados à produção deste biocombustível.

6. Lipases na produção de ácidos graxos poli-insaturados Ômega-3

Os ácidos graxos poliinsaturados, denominados PUFAs em inglês, são uma classe de lipídeos de grande diversidade e importância biológica. Quando a primeira dupla ligação interrompida por metileno ocorre no terceiro átomo de carbono da extremidade metil da cadeia de um ácido graxo, este é denominado de ômega-3. Os principais PUFAs ômega-3 são o ácido α -linolênico (C18:3 $\Delta^{9, 12, 15}$), o ácido estearidônico (C18:4 $\Delta^{6, 9, 12, 15}$), o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5 $\Delta^{5, 8, 11, 14, 17}$), o ácido docosapentaenóico (C22:5 $\Delta^{7, 10, 13, 16, 19}$) e o ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 $\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$). No organismo, os PUFAs ômega-3 podem ser encontrados em sua forma de ácido graxo livre ou na composição de triacilgliceróis e fosfolipídeos, sendo estas formas esterificadas habitualmente mais frequentes como forma de armazenagem de lipídeos ou na formação de membranas celulares, respectivamente.

O crescente interesse por PUFAs ômega-3 está relacionado com suas importantes propriedades e atividades biológicas, desempenhando um papel

fundamental na promoção da saúde (Shahidi e Ambigaipalan, 2018). Foi demonstrado que o DHA é o principal componente da massa cinzenta do cérebro e que os fosfolípidos derivados de ômega-3 são essenciais componentes da retina (Senanayake e Fichtali, 2006). Evidências clínicas têm demonstrado outras de suas diversas atividades biológicas: redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, diminuição dos níveis de triacilgliceróis e colesterol circulantes no plasma e controle da hipertensão (Mozaffarian e Wu, 2011); como suplementos ergogênicos que auxiliam no desempenho de esportes e treinos de alta intensidade (Gammone et al., 2019); desenvolvimento de funções do sistema nervoso (Beltz et al., 2007); dando origem a mediadores anti-inflamatórios, ajudando a diminuir o risco de doenças autoimunes crônicas, como artrite reumatoide e diabetes mellitus tipo 1 (Abdolmaleki et al., 2020); e até mesmo como agentes preventivos e terapêuticos em transtornos psiquiátricos, como ansiedade e depressão (Su et al., 2018).

A síntese de PUFA's ômega-3 é um processo dependente de enzimas dessaturases, responsáveis por adicionar insaturações às extremidades metil dos ácidos graxos. Os vertebrados não possuem as dessaturases necessárias à biossíntese destes compostos, sendo necessária e essencial a implementação destes nutrientes por meio da dieta ou de suplementação. A fonte primária de síntese dos PUFA's é de origem marinha, sendo algas e outros organismos unicelulares os principais produtores. Entretanto, estes nutrientes são acumulados nos tecidos de animais de maior nível trófico, podendo ser encontrados em grande quantidade em peixes de águas profundas - como salmão, arenque e truta - e também em mamíferos marinhos. Mais recentemente foi demonstrada a capacidade de alguns invertebrados em sintetizar PUFA's, incluindo cnidários, moluscos e artrópodes na lista de organismos fonte destes nutrientes (Kabeya et al., 2018).

Tendo em vista a necessidade do consumo e a busca cada vez maior por suplementação de PUFA's, encontra-se uma grande variedade de nutracêuticos disponíveis no mercado. Dentre as formas comercializadas, podem ser encontrados como ésteres, como ácidos graxos livres e também como triacilgliceróis, sendo esta última forma a mais comum, por ser a forma

mais bruta dos óleos de peixe. Além disso, os PUFAs ômega-3 mantêm suas propriedades quando embalados em alimentos saudáveis, sendo possível a sua implementação em alimentos fortificados (Panse e Phalke, 2016).

Schuchardt et al. (2011) relataram que os produtos contendo etil ésteres podem ter biodisponibilidades mais baixas do que as formulações comercializadas como ácidos graxos livres. Para absorção pelo organismo, os ésteres etílicos precisam ser hidrolisados pela ação de lipases pancreáticas e, assim, liberar ácidos graxos com capacidade de absorção. Deste modo, estudos demonstraram que a digestão e a absorção de várias formas de PUFAs ômega-3 são altamente dependentes do conteúdo de gordura da refeição, o que aumenta a atividade das enzimas pancreáticas. As formulações com ácidos graxos livres, por outro lado, podem ser diretamente absorvidas, sendo contornada a necessidade de enzimas pancreáticas e do teor de gordura da refeição, o que acaba por se tornar uma vantagem (Shahidi e Ambigaipalan, 2018).

Segundo Zarai e colaboradores (2020), a produção de concentrados de PUFAs ômega-3 geralmente envolve uma transesterificação dos triacilgliceróis de óleo de peixe com etanol, obtendo-se ésteres de ácido graxo e glicerol como produtos finais da reação, podendo em certas condições haver acúmulo de intermediários, como diacilgliceróis e monoacilgliceróis. O processo de síntese química envolve o emprego de catalisadores alcalinos inorgânicos e de altas temperaturas, não sendo adequados para óleos tão sensíveis como óleos de peixe. Deste modo, processos enzimáticos acabam sendo uma abordagem alternativa mais atraente, pois a reação pode ser realizada em condições moderadas, preservando as qualidades dos compostos de interesse.

As lipases podem ser utilizadas no processamento de óleos de peixe brutos, enriquecendo sua composição de PUFAs. Carvalho e colaboradores (2009) aplicaram três diferentes lipases microbianas a um processo de hidrólise de óleo de salmão, alcançando um fator de enriquecimento na quantidade de DHA de 2,4 vezes em relação ao teor original. O uso de lipases imobilizadas em um sistema aquoso bifásico também tem se destacado como uma

estratégia interessante para a obtenção de óleos enriquecidos com PUFA omega-3 (Fernandez-Lorente et al., 2011; Morais Júnior *et al.*, 2017).

7. Outras aplicações industriais de lipases

As lipases são consideradas os biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas (Jaeger e Eggbert, 2002). Em especial, estas enzimas são capazes de atuar na produção de intermediários para síntese orgânica, sendo este alvo de diferentes estudos. O uso de lipases na síntese orgânica tem se tornado cada vez mais atrativo devido a vantagens como uma ampla especificidade de substrato e elevadas quimio-, regio- e estereoseletividades exibidas por estas enzimas na produção de intermediários químicos chave de diversos grupos funcionais, como polióis, álcoois quirais, ácidos carboxílicos quirais e aminas quirais (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

Na indústria de alimentos, as lipases podem ser utilizadas, por exemplo, para a síntese de flavorizantes, como na maturação de queijos (Holland *et al.*, 2005) ou até mesmo para resolução de gargalos industriais, como no caso apresentado por Jahangiri e colaboradores (2018), que utilizaram a lipase CalB (Novozyme 435) para síntese de um novo éster derivado da bixina com maior solubilidade em ambientes aquosos e, assim, com propriedades mais adequadas à sua utilização na indústria de alimentos.

Por sua vez, na indústria farmacêutica, as lipases podem ser aplicadas na catálise assimétrica para obtenção de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos por meio da resolução de misturas racêmicas, como para o medicamento ibuprofeno (Hongwei *et al.*, 2005), ou mesmo para obtenção de intermediários na síntese de fármacos, como o (R)-ácido mandélico (Morais Júnior *et al.*, 2018).

Outras aplicações das lipases incluem a indústria de aromas e cosméticos (síntese de aromas e flavorizantes referentes a ésteres de ácidos graxos com álcoois de cadeia curta ou monossacarídeos), a indústria de processamento do couro (hidrólise da camada de gordura subcutânea, favorecendo a obtenção de um produto de maior valor agregado) e a indústria

de detergentes (aditivos em preparações de materiais de limpeza com maior eficiência na remoção de manchas de gordura).

Algumas preparações comerciais de lipases já são utilizadas em diversos processos industriais. Devido à sua alta performance, algumas destas enzimas são comercializadas para uma aplicação específica enquanto outras podem ser usadas em diferentes campos. No entanto, apesar da grande quantidade de lipases disponíveis no mercado, as aplicações permanecem limitadas devido ao alto custo de obtenção destes biocatalisadores. Outros fatores envolvem a obtenção de grandes volumes em quantidades industriais e o baixo desempenho de alguns processos, podendo ser estes alvos de novos estudos. A Tabela 3 exemplifica alguns processos com uso de lipases comerciais.

Tabela 3. Lipases comercialmente disponíveis e suas aplicações industriais. Adaptado de Houde *et al.*, 2004.

Indústria	Aplicação	Nome Comercial	Microrganismo	Fornecedor
Couro	Remoção de gordura subcutânea	Greasex [®]	Não especificado	Novozymes
Cosméticos	Produção de miristato de isopropila	Novozym [®] 435	<i>Candida antarctica</i> B	Novozymes
Detergentes	Remoção de gorduras	Lipolase [®]	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novozymes
Farmacêutica	Síntese de compostos quirais	Lipase PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano
Laticínios	Maturação de queijos	Palatase [®]	<i>Rhizomucor miehei</i>	Novozymes
Óleos e Gorduras	Interesterificação de óleos vegetais	Lipozyme [®] TL IM	Não especificado	Novozymes
Panificação	Melhoramento de textura da massa	Lipomod [™] 627P-L627P	<i>Rhizopus oryzae</i>	Biocatalysts
Papel	Controle do <i>pitch</i>	Resinase [®]	<i>Candida rugosa</i>	Novozymes

JUSTIFICATIVA

Devido à sua versatilidade e capacidade de realizar reações tanto em meios aquosos como não aquosos, as lipases são o grupo de enzimas com maior aplicação biotecnológica industrial (Jaeger e Eggbert, 2002). Entretanto, um dos grandes limitantes à utilização das lipases ainda tem sido o custo de obtenção destes biocatalisadores. Neste sentido, a busca por novas lipases aliada à otimização do uso destas a processos biotecnológicos tem demonstrado grande potencial para a consolidação da aplicação destes biocatalisadores. De fato, projeta-se que o mercado de lipases atinja um valor de U\$ 797,7 milhões até 2025 com uma taxa de crescimento anual em torno de 6,2%, principalmente devido aos crescentes avanços tecnológicos na indústria de alimentos e bebidas (BCC Research, 2018). No contexto brasileiro, o mercado de enzimas ainda é muito dependente de empresas multinacionais, com uma balança comercial negativa ao longo de sucessivos anos (Daiha *et al.*, 2016). Considerando o grande potencial da biodiversidade brasileira, faz-se necessário que o país passe a produzir suas próprias enzimas, reduzindo sua dependência de indústrias estrangeiras e possibilitando o uso de insumos mais baratos. Assim, espera-se que o conhecimento adquirido academicamente possa ser aplicado em um contexto industrial por meio da transferência e difusão de ciência e tecnologia, da integração entre pesquisas básica e aplicada e da concepção de produtos e serviços tecnológicos que fomentem a criação e ampliação de parcerias estratégicas de cooperação entre a academia e empresas nacionais e internacionais. Destaca-se, ainda, que a promoção do uso de enzimas em aplicações industriais proporcionará não só o fortalecimento da presença brasileira na economia global do conhecimento, mas também o desenvolvimento socioeconômico do país através de uma abordagem de temática transversal, como o desenvolvimento sustentável.

Outrossim, este projeto está em consonância com os objetivos do decreto presidencial nº 6.041/2007, no qual se estabelecem, dentre outras metas, que sejam desenvolvidas tecnologias enzimáticas para a obtenção de produtos úteis e de maior valor agregado, com ênfase na utilização da biodiversidade brasileira como fonte de biocatalisadores e substituição de processos químicos por processos biotecnológicos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo isolar e selecionar microrganismos produtores de lipases, produzir lipases por meio do cultivo destes microrganismos por fermentação em estado sólido e aplicá-las em processos biotecnológicos de interesse industrial.

Objetivos específicos

- Isolar microrganismos associados aos frutos de dendê e resíduos agroindustriais da cadeia produtiva do dendê;
- Realizar triagem de microrganismos produtores de lipase por meio de testes qualitativos em meios seletivos e de testes quantitativos por meio de ensaios de atividade lipolítica;
- Selecionar os microrganismos mais promissores para otimização da produção de lipases por fermentação em estado sólido;
- Realizar uma análise proteômica do secretoma obtido da condição otimizada de cultivo em busca das carboxilesterases componentes do extrato enzimático bruto;
- Purificar e caracterizar bioquimicamente lipases microbianas;
- Aplicar as lipases obtidas à síntese de biodiesel;
- Imobilizar e estabilizar lipases microbianas e aplicá-las para hidrólise de óleos de peixe para obtenção de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3;
- Obtenção e otimização da expressão de uma forma recombinante da lipase BGL em *Escherichia coli*.

Parte experimental

A fim de melhor separar o conteúdo referente à parte experimental e facilitar a compreensão dos estudos realizados, o presente trabalho foi fracionado em capítulos. O fluxograma apresentado na Figura 9 representa a coesão dos capítulos em relação à unidade da tese.

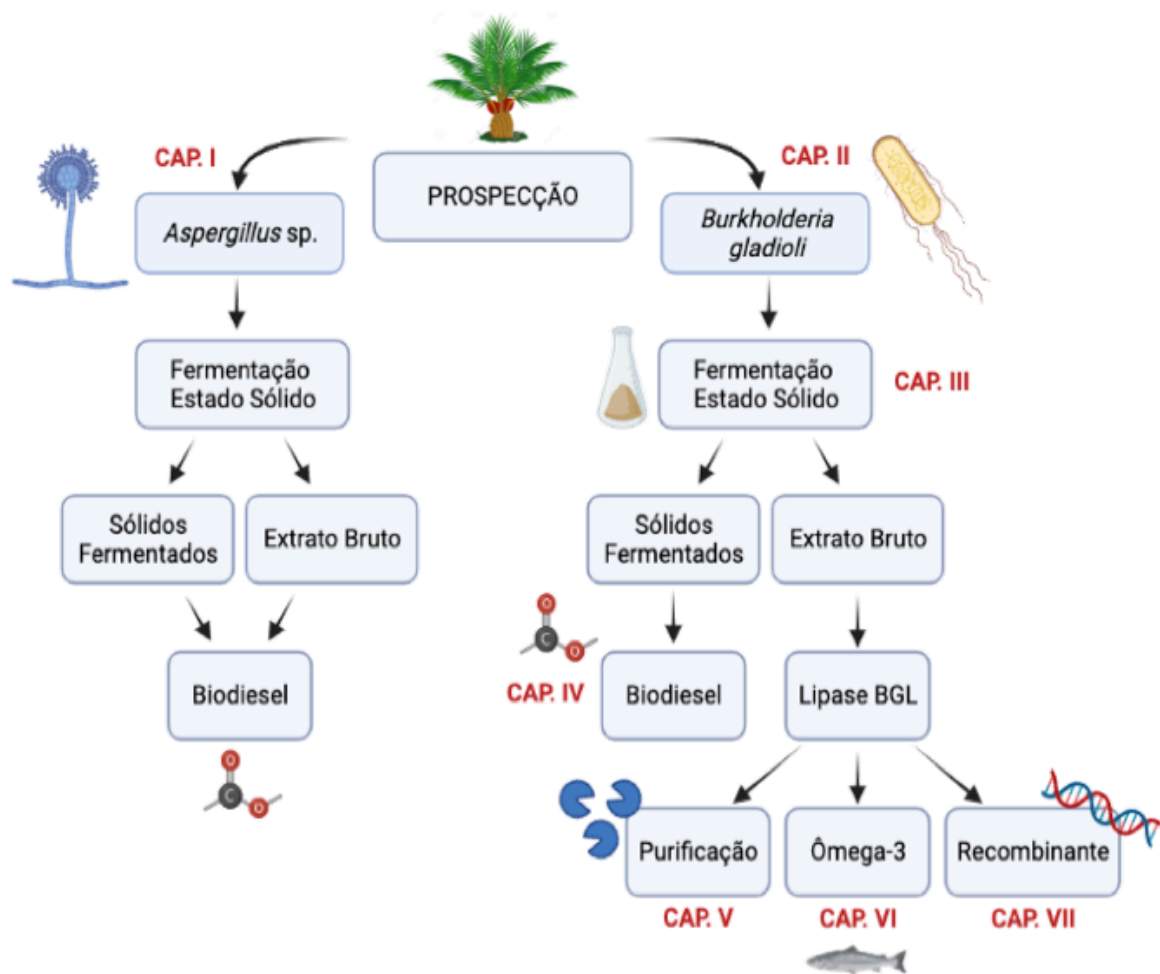


Figura 9. Fluxograma da estrutura da parte experimental do trabalho.

Cada capítulo corresponde a uma seção de experimentos conforme exposto abaixo:

- I. Prospecção de microrganismos associados ao dendezeiro (*Elaeis guineenses* Jacq.): produção de lipases de *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) e aplicação na síntese de ésteres etílicos;
- II. Seleção de bactérias associadas aos frutos de dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.) e seu potencial para produção de lipases;
- III. Produção por fermentação em estado sólido e caracterização de uma lipase alcalina de *Burkholderia gladioli* BRM58833;
- IV. Síntese de ésteres etílicos a partir de sólidos fermentados por *Burkholderia gladioli* BRM58833: otimização e reuso;
- V. Purificação e caracterização da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833;
- VI. Imobilização e estabilização da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 para produção de ômega-3 por hidrólise de óleo de peixe; e
- VII. Expressão heteróloga e otimização da produção da lipase BGL em *Escherichia coli*.

CAPÍTULO I – PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO DENZEIRO (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.): PRODUÇÃO DE LIPASES DE *ASPERGILLUS* SP. (BDA-FI 7) E APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS

1. Objetivos

Até o momento, poucos estudos tem explorado o potencial de produção de enzimas por microrganismos associados ao dendzeiro. Deste modo, este trabalho teve como objetivo buscar por microrganismos produtores de lipase associados a frutos e resíduos da cadeia produtiva de dendê, bem como cultivar estes microrganismos por fermentação em estado sólido para obtenção de lipases e sua aplicação na síntese de biodiesel.

2. Metodologia

2.1 Materiais prospectados

Foram coletados frutos maduros de dendê (*Elaeis guineensis*) da palmeira B2X2, que faz parte do grupo de palmeiras irrigadas em uma plantação na Embrapa Cerrados. Com auxílio de luvas e utensílios sanitizados com etanol 70%, amostras de frutos maduros foram coletadas (coordenadas do GPS: S153609.1 / W0474338.6 / 1.048 metros) a partir dos cachos e imediatamente armazenadas em sacos plásticos transparentes devidamente identificados. As amostras foram transportadas em caixas de isopor com gelo até o Laboratório de Processos Bioquímicos, na Embrapa Agroenergia, e foram imediatamente processadas para o isolamento de microrganismos.

Prospectou-se, também, microrganismos em amostras de resíduos agroindustriais da produção do óleo de dendê (cachos vazios e fibra de prensagem dos frutos), bem como de frutos de dendê, provenientes da empresa Denpasa (Belém-PA).

Todas as amostras foram utilizadas para a prospecção de microrganismos produtores de lipases.

2.2 Meios de cultura

Ao longo de todo o trabalho foram utilizados os seguintes meios de cultura para isolamento e manutenção dos microrganismos: YPG 2% (extrato de levedura 10 g.L⁻¹; peptona bacteriológica 20 g.L⁻¹; glicose 20 g.L⁻¹ e ágar 20 g.L⁻¹), LBA (39 g.L⁻¹ da mistura comercial HiMedia; ágar 5 g.L⁻¹) e BDA (40 g.L⁻¹ da mistura comercial HiMedia; ágar 5 g.L⁻¹). Em seguida ao preparo, os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C com pressão de 1 atm por 30 min. Quando bactérias foram cultivadas, adicionou-se fungicida (amphotericina B 5,6 mg.L⁻¹). Quando fungos filamentosos ou leveduras foram cultivados, adicionou-se antibiótico (sulfato de estreptomicina 70 mg.L⁻¹).

2.3 Isolamento dos microrganismos

2.3.1 Endofíticos

Para isolar os microrganismos endofíticos, realizou-se procedimento de sanitização química do exterior dos frutos de dendê. Estes foram tratados nas seguintes soluções, em ambiente estéril e em sequência: etanol 70% (105 segundos), NaClO 11% (120 segundos), etanol 70% (105 segundos) e cinco lavagens com água destilada (60 segundos cada). Os frutos de dendê sanitizados foram cortados em pedaços bem pequenos e, destes, foram separados 30 g do mesocarpo do fruto. A polpa obtida foi macerada com 36 mL tampão PBS (NaCl 8 g.L⁻¹; KCl 0,2 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 1,44 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 0,24 g.L⁻¹; pH 7,4) até obter uma pasta fibrosa que foi transferida para um erlenmeyer com pérolas de vidro. Adicionaram-se mais 114 mL de tampão, totalizando um volume final de 150 mL. O erlenmeyer foi condicionado em agitador orbital de bancada e agitado por 2 h a 30 °C e 200 rpm. Após o período de incubação, realizou-se uma diluição seriada em tampão PBS a fim de obter as diluições 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴, que foram plaqueadas e incubadas a 30 °C em duplicata, nos três meios de cultura: YPG (para o isolamento de leveduras), LBA (para o isolamento de bactérias) e BDA (para o isolamento de fungos filamentosos). A partir das placas obtidas, cada colônia foi separada em nova placa e submetida à técnica de esgotamento até a obtenção de colônias puras. No caso dos fungos filamentosos foi utilizada a técnica do ponto central, onde parte do

micélio, ou dos esporos, foi repicada para uma nova placa até a obtenção de culturas puras.

Todos os microrganismos isolados foram estocados e armazenados na coleção “Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorefinarias” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia e foram registrados junto ao SISGEN, sob número A5F079B para acesso ao patrimônio genético.

2.3.2 Fruto inteiro

Como neste caso a sanitização externa dos frutos não foi necessária, o procedimento do experimento ocorreu conforme a padronização feita para a extração dos endofíticos, exceto pelas etapas de lavagem do fruto. Os frutos utilizados foram provenientes da mesma coleta utilizada nos experimentos com os microrganismos endofíticos (item 2.3.1).

Todos os microrganismos isolados foram estocados e armazenados na coleção “Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorefinarias” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia e foram registrados junto ao SISGEN, sob número A5F079B para acesso ao patrimônio genético.

2.3.3 Microrganismos isolados de amostras de resíduos da cadeia produtiva do dendê

Prospectou-se microrganismos a partir de resíduos da cadeia produtiva do dendê doados pela empresa Denpasa (Belém-PA). A fibra de prensagem do fruto (torta de dendê), os cachos de dendê vazios e os frutos de dendê maduros foram utilizados para a prospecção de microrganismos produtores de lipase. O procedimento do experimento ocorreu da mesma forma como foi feita a extração dos microrganismos de fruto inteiro (item 2.3.2).

Todos os microrganismos isolados foram estocados e armazenados na coleção “Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorefinarias” (CMMAABio) da Embrapa Agroenergia e foram registrados junto ao SISGEN, sob número A5F079B para acesso ao patrimônio genético.

2.4 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos

2.4.1 Meio Trioleína / Azul do Nilo A

O meio Trioleína/Azul do Nilo A foi utilizado para avaliar qualitativamente a produção de lipases. Quando secretada, a lipase do microrganismo promove a hidrólise do substrato, liberando ácidos graxos no meio e fazendo com que o composto Azul de Nilo A, um indicador de pH, tenha sua cor alterada de roxo para azul claro. A atividade enzimática é indicada pela formação de um halo azul claro ao redor da colônia (Lee & Rhee, 1993). O meio é composto de ágar nutriente 8 g.L⁻¹; trioleína 0,25% (v/v); corante Azul do Nilo A 0,01% (m/v) e ágar 20 g.L⁻¹. O pH do meio é, então, ajustado para 7,0. Em seguida ao preparo, o meio e o dispersor do ultraturrax são esterilizados em autoclave a 121 °C com pressão de 1 atm por 30 min. Após este processo o meio é levado ao ultra-turrax, onde é homogeneizado por 10 min até formar uma emulsão estável que é, por fim, distribuída em placas de Petri. Os microrganismos foram repicados em triplicata por meio da técnica do ponto central, visando um crescimento radial para que a formação dos halos de hidrólise pudessem ser observadas.

2.4.2 Meio Óleo de Oliva / Rodamina B

O meio Óleo de Oliva/Rodamina B foi utilizado para avaliar qualitativamente a produção de lipases. Com a hidrólise do substrato, os ácidos graxos liberados interagem com a Rodamina B presente no meio, promovendo a formação de um complexo que pode ser visualizado como um halo fluorescente laranja contrastante com o meio opaco rosa. A visualização dos halos só é possível com a irradiação de luz ultravioleta no meio (Kouker & Jaeger, 1987). O meio é composto de ágar nutriente 8 g.L⁻¹; óleo de oliva 2% (v/v); corante Rodamina B 0,007% (m/v) e ágar 20 g.L⁻¹ (Maciel *et al.*, 2011). O pH do meio é, então, ajustado para 7,0. Em seguida ao preparo, o meio e o dispersor do ultraturrax são esterilizados em autoclave a 121°C com pressão de 1 atm por 30 min. Após este processo o meio é levado ao ultra-turrax, onde é homogeneizado por 10 min até formar uma emulsão estável que é, por fim, distribuída em placas de Petri. Os microrganismos foram repicados em triplicata por meio da técnica do ponto central, visando um crescimento radial

para que a formação dos halos de hidrólise pudessem ser observadas.

2.5 Cultivo dos microrganismos por fermentação em estado sólido (FES)

Os microrganismos que apresentaram halos nos testes qualitativos em placa (item 2.4) foram testados também por meio de fermentação em estado sólido com o objetivo de obter um extrato enzimático que pudesse ser avaliado quantitativamente.

Cada microrganismo foi avaliado em dois tempos de cultivo distintos, sendo retirada uma duplicata do cultivo a cada tempo. Os cultivos foram feitos utilizando-se 4 g de substrato em erlenmeyers de 250 mL. Os substratos avaliados foram torta de dendê (Denpasa), farelo de trigo (Bünge) ou uma mistura dos dois conforme o cultivo. Para as análises realizadas, a granulometria dos substratos não foi avaliada. Para os fungos filamentosos provenientes do isolamento de microrganismos endofíticos, o substrato/suporte sólido foi adicionado de tampão fosfato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0 até atingir um teor de umidade de 65%. A umidade foi determinada em analisador de umidade com lâmpada infravermelha halógena IV3100 (Gehaka). Para o restante dos fungos filamentosos, o substrato/suporte sólido foi acrescido de meio de cultura (K_2HPO_4 $0,7 \text{ g.L}^{-1}$; KH_2PO_4 $0,4 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,2 \text{ g.L}^{-1}$; CaCl_2 $0,1 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mg.L^{-1} ; ZnSO_4 2 mg.L^{-1} ; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mg.L^{-1} ; glicose 1 g.L^{-1} ; extrato de levedura 2 g.L^{-1} ; pH 7,0; Alberton *et al.*, 2009) também até atingir um teor de umidade de 65%. Para as bactérias e leveduras o meio utilizado para umedecer foi conforme estabelecido por Salum (2010) e o teor de umidade estabelecido foi de 75%. O processo de umedecimento foi realizado em duas etapas, sendo uma anterior à esterilização e outra no momento do inóculo dos esporos (ou do pré-inóculo no caso das bactérias e leveduras). Deste modo, adicionou-se o volume de tampão/meio de cultura até faltar apenas 1 mL e a mistura foi homogeneizada com espátula. O substrato/suporte sólido umedecido foi acrescido, ainda, de 225 μL de óleo de oliva de forma a obter uma proporção de 5% de óleo (m/m) em cada erlenmeyer. Os erlenmeyers foram, então, esterilizados em autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ com pressão de 1 atm por 30 min. O volume de 1 mL restante foi adicionado na

forma de suspensão de esporos no momento do inóculo do microrganismo, atingindo o teor de umidade estabelecido.

Para os fungos filamentosos, foi feita uma raspagem das placas de BDA para obtenção de esporos para o inóculo. A raspagem foi feita com o mesmo tampão ou meio utilizado no cultivo acrescido de Tween 80 0,01%. Uma alíquota da suspensão coloidal de esporos obtida foi levada à câmara de Neubauer, onde foi feita uma contagem dos esporos e a determinação da concentração dos mesmos. Com os valores obtidos, foi feita uma diluição da suspensão original em tampão a fim de obter uma solução de $4,0 \times 10^7$ esporos.mL⁻¹ (10^7 esporos.g⁻¹ de substrato seco) e 1 mL foi utilizado para inocular a fibra umedecida de cada erlenmeyer. No caso das bactérias e leveduras, preparou-se um pré-inóculo do microrganismo no mesmo meio em que foi originalmente isolado. Quando a densidade óptica OD_{600nm} atingiu 0,8, 1 mL deste pré-inóculo foi utilizado para inocular o meio de cultura sólido. Posteriormente, os cultivos de fungos, bactérias e leveduras foram incubados a 30 °C em estufa sem controle de umidade e uma duplicata de cada microrganismo foi retirada em dois tempos, 3 e 5 dias para cultivos de bactérias e leveduras e 5 e 7 dias para os fungos filamentosos.

Após coleta das amostras, iniciou-se a extração das enzimas dos fermentados sólidos. Para cada extração foi separado 1 g de fermentado sólido e transferido para um erlenmeyer menor, contendo 15 mL de uma solução de NaCl 2%. Este erlenmeyer foi submetido à agitação de 150 rpm e a uma temperatura de 30 °C por 1 hora. Ao final do período, o líquido obtido foi centrifugado a $10.700 \times g$ e a uma temperatura de 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi coletado, denominado de extrato enzimático bruto e, então, utilizado nas análises de determinação de atividade lipolítica pelos métodos colorimétrico (item 2.7.1) e titulométrico (item 2.7.2). Para os sólidos fermentados a atividade lipolítica foi determinada apenas pelo método titulométrico (item 2.7.2).

2.6 Identificação Molecular por ITS

O fungo filamentoso BDA-FI 7 foi isolado e cultivado em meio caldo batata dextrose por 7 dias a 28 °C. Em seguida, o DNA genômico foi extraído e

utilizado na amplificação da região ITS1 – 5.8S – ITS2 por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) é conhecida por espaçar regiões codificadoras de RNA ribossomal estrutural e, por ser muito conservada ao nível de gênero e espécie, tem sido utilizada para taxonomia e filogenia molecular. Os *primers* utilizados foram ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) e ITS4-R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) para amplificar uma região de aproximadamente 600 pb (White *et al.*, 1990). Cada reação foi preparada atingindo um volume final de 50 μL e continha 0,2 mmol.L^{-1} de dNTP, 3,7 mmol.L^{-1} de MgCl_2 , 5 μL tampão 10x (Life Technologies), 1 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies), 0,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada *primer* e 1 μL de DNA genômico como *template*. Os parâmetros do ciclo térmico foram os seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e extensão final de 72 °C por 10 min. Após amplificação por PCR, os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) e visualizados sob UV por intercalação com brometo de etídio. Os produtos de amplificação foram então purificados com o *PureLink® PCR Purification Kit* (Life Technologies) e sequenciados. As sequências foram analisadas no CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com>) para os parâmetros de qualidade e obtenção da sequência consenso, que foi, então, comparada frente ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) por meio da ferramenta nBLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7 Ensaios enzimáticos para determinação de atividade lipolítica

2.7.1 Ensaio colorimétrico (pNPP)

A atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos foi determinada conforme metodologia descrita por Winkler e Stuckmann (1979) com modificações, conforme descrito abaixo.

Para preparar a solução de substrato, uma parte da solução A (palmitato de *p*-nitrofenila 3 mg.mL^{-1} em 2-propanol) foi combinada com nove partes da solução B (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,0; 0,4% Triton X-100, m/v; 0,1% de goma arábica, m/v). A solução A foi adicionada gota a gota sobre a solução B, sob constante agitação. Os ensaios foram realizados misturando 0,9

mL de solução de substrato com 0,1 mL de extrato bruto apropriadamente diluído. As reações ocorreram a 37 °C durante 1 minuto com leituras a cada 10 segundos, medindo o aumento da concentração de *p*-nitrofenol (*p*NP) a 410 nm, produzido por hidrólise de palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). A atividade enzimática foi quantificada a partir da curva de calibração com regressão de ajuste linear obtida para o *p*NP (7 – 450 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) em condições de ensaio. O coeficiente de absorvidade molar do *p*NP em pH 7,0 foi determinado experimentalmente em 4681,1 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para as condições de reação. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*NP por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para análise estatística.

2.7.2 Ensaio titulométrico

Além da análise da atividade enzimática do extrato, é importante avaliar a atividade enzimática do próprio sólido fermentado. Como não é possível fazer esta análise por meio do ensaio convencional do *p*NPP, utilizou-se um outro método, o titulométrico. Neste ensaio, a atividade da enzima é percebida pela titulação com NaOH dos ácidos graxos liberados pela ação da enzima na hidrólise dos triacilgliceróis presentes em substratos naturais. Como a estequiometria da reação é de 1 mol de hidróxido de sódio para 1 mol de ácido graxo, a medida de hidróxido de sódio utilizado para manutenção do pH é equivalente à medida de ácidos graxos liberados pela reação de hidrólise. Assim, a atividade lipolítica foi determinada de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Diaz (2006) com modificações, conforme descrito abaixo.

Para preparar os meios reacionais, os substratos 66 mmol.L^{-1} (tributirina, tricaprilina, trioleína ou azeite de oliva extra-virgem) foram emulsificados em uma solução de tampão TRIS-HCl 2,5 mmol.L^{-1} pH 7,0, NaCl 150 mmol.L^{-1} , CaCl_2 2 mmol.L^{-1} e 3% de goma arábica (m/v) usando um homogeneizador ultra-turrax. Para cada reação, 20 mL de emulsão foram misturados com 1 mL de extrato bruto apropriadamente diluído e foram titulados com uma solução de NaOH a 20 mmol.L^{-1} utilizando um sistema de titulação automático (Metrohm –

Titrande Stat 902) no modo pH-Stat. As reações foram conduzidas a pH 7,0 e 37 °C. Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de ácidos graxos livres por minuto nas condições do ensaio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para análise estatística.

2.8 Análises Estatísticas

2.8.1 Teste de Tukey

A análise estatística foi empregada para verificar diferenças significativas entre amostras independentes após etapa de quantificação da atividade lipolítica. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (Tukey, 1953).

2.8.2 Teste de Comparação de Médias

Para avaliar a influência do pH inicial do cultivo por FES na produção de lipases, foi empregada o teste de hipótese para igualdade de médias com variâncias estatisticamente iguais. A análise estatística foi realizada considerando amostras independentes e um nível de significância de 5%.

2.8.3 Delineamento composto central rotacional (DCCR)

A etapa de otimização da produção da lipase foi feita por meio de planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), originalmente descrito por Box e Wilson (1951) e utilizado com sucesso para otimização de processos por Myers e Montgomery (2002), considerando cinco níveis e três variáveis de cultivo independentes na análise. O experimento foi conduzido conforme matriz gerada com três variáveis e quatro repetições do ponto central, totalizando 18 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,68. As variáveis independentes consideradas foram: temperatura variando de 20 °C a 35 °C (X_1), umidade variando de 45% a 65% (X_2) e tamanho do inóculo variando de 1×10^6 esporos.g⁻¹ a 100×10^6 esporos.g⁻¹ (X_3). As faixas de estudo para cada variável foram escolhidas conforme dados da literatura para cultivo de *Aspergillus sp.* por fermentação em estado sólido e também conforme limitações do substrato. A produção de

lipases foi avaliada em três tempos de cultivo distintos (4, 7 e 10 dias) conforme atividade lipolítica determinada pela hidrólise do pNPP (método colorimétrico).

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi feita utilizando o *software* Statistica (v. 12.0). Foi considerado um nível de significância de 90% ($p < 0,1$) devido à variabilidade dos bioprocessos (Haaland, 1989). Para validar as previsões do modelo, novas fermentações foram realizadas sob condições previstas pelos modelos.

2.9 Síntese de Ésteres Etílicos

Os extratos enzimáticos e sólidos fermentados que apresentaram atividade de hidrólise foram submetidos a uma etapa de liofilização e, em seguida, à reação de síntese (transesterificação). Esta foi realizada com razão óleo:álcool 1:3. Para isto, foram utilizados 10 mmol de óleo de soja refinado (Soya) e 30 mmol de álcool etílico (Sigma). Ao meio reacional, adicionou-se água destilada 0,5% m/m (Salum *et al*, 2010), totalizando um volume de 10,78 mL por reação. Cada reação foi preparada individualmente em frascos do tipo erlenmeyer vedados com rolha. A cada reação foram adicionados 90 U de enzima, seja esta na forma de sólidos fermentados liofilizados, extrato enzimático bruto liofilizado ou lipase de *Burkholderia cepacia* (Amano). O controle negativo da reação consistiu de um meio reacional incubado sem qualquer tipo de adição de enzima. Avaliou-se, também, a necessidade da utilização de solvente orgânico (*n*-heptano) para a proteção da conformação estrutural da lipase. Os erlenmeyers contendo meio reacional foram, então, incubados a 37°C com agitação de 120 rpm e alíquotas foram coletadas para acompanhamento da reação por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa (CG) para análise de teor de ésteres.

Avaliou-se, ainda, a utilização dos SFL (sólidos fermentados liofilizados) para a reação de transesterificação em reator de leito fixo. Para isso, 1 g de SFL foi empacotado em um reator de leito fixo por onde recirculou-se 10 mL do mesmo meio reacional descrito no item 2.9 em um frasco vedado e conectado ao reator. O meio foi recirculado com o uso de uma bomba peristáltica com

fluxo ascendente constante. O frasco foi mantido sob constante agitação e a reação toda ocorreu com temperatura controlada de 37°C.

2.10 Quantificação de Ésteres Etilícos

2.10.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio ALUGRAM® XTRA SIL G/UV₂₅₄ (espessura 0,20 mmol.L⁻¹; Macherey-Nagel) nas dimensões de 10 x 10 cm com fase móvel constituída de Hexano:Éter Etilíco:Ácido Acético na proporção 70:29:01. Como padrões utilizou-se biodiesel de óleo de soja, óleo de Soja (Soya) e ácido oléico (Dinâmica), diluindo 20 µL em 300 µL de hexano. Para a revelação, a placa foi incubada com iodo ressublimado até a visualização das manchas correspondentes a cada fração da amostra.

2.10.2 Cromatografia gasosa

A determinação do teor total de ésteres foi realizada por cromatografia gasosa conforme metodologia da norma NBR 15764 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2015).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e seleção de microrganismos produtores de lipase

O isolamento de microrganismos associados aos frutos e resíduos da cadeia produtiva do dendê teve como objetivo a busca por espécies secretoras de lipases verdadeiras. Ao total, foram isolados 298 microrganismos, sendo 69 microrganismos endofíticos (associados ao mesocarpo de frutos de dendê maduros), 163 microrganismos associados aos frutos de dendê (endofíticos e epifíticos) e 66 microrganismos associados a resíduos da cadeia produtiva do dendê, sendo 30 isolados a partir de cachos vazios e 36 da fibra de prensagem (Figura I.1). Também conhecida como torta de dendê, a fibra de prensagem é

um resíduo fibroso e rico em lipídeos, sendo resultante do processo de prensa dos frutos maduros para a obtenção do óleo de palma.

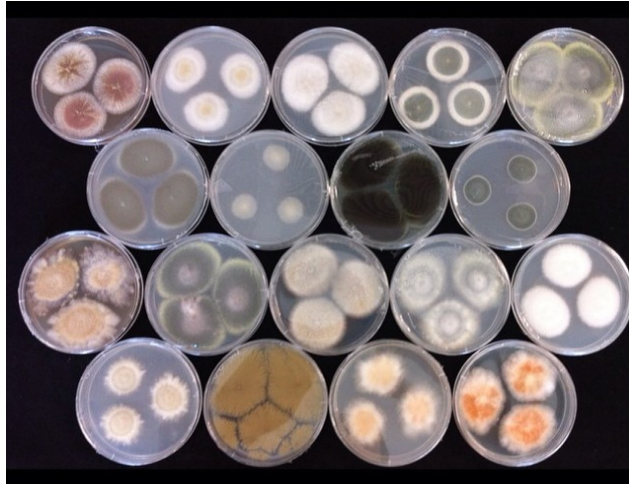


Figura I.1. Exemplos da diversidade de fungos filamentosos isolados a partir da prospecção de microrganismos produtores e secretores de lipases.

Antes da utilização dos microrganismos isolados para a produção de lipases é necessário testar quais são capazes de secretar as enzimas em questão. Deste modo, é importante realizar um *screening* inicial e, a partir deste, selecionar os melhores produtores para testes quantitativos posteriores. Assim, os microrganismos isolados foram, então, simultaneamente repicados nos meios Trioleína/Azul de Nilo A e Óleo de Oliva/Rodamina B e tiveram seus halos de hidrólise avaliados após 5 dias de crescimento nos meios seletivos (Figura I.2).

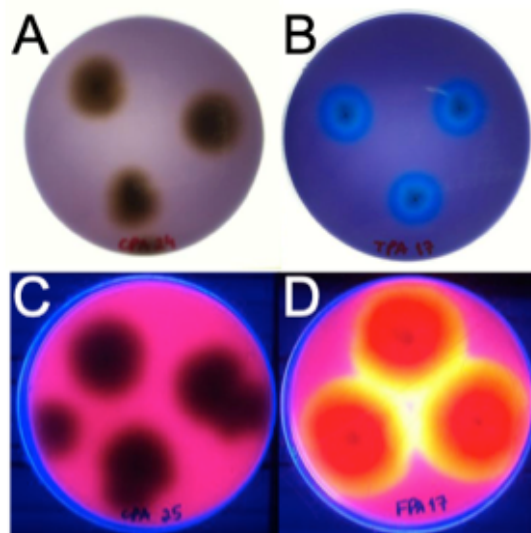


Figura 1.2. Testes qualitativos para determinação da secreção de lipases por microrganismos. A: Resultado negativo (fungo CPA-24, isolado de cachos de dendê vazios); B: resultado positivo para a análise em meio Trioleína/Azul do Nilo A (fungo TPA-17, isolado da fibra de prensagem de frutos de dendê); C: Resultado negativo (fungo CPA-25, isolado de cachos de dendê vazios); e D: resultado positivo para a análise em meio Óleo de Oliva/Rodamina B (fungo FPA-17, isolado de frutos de dendê).

Quando secretada no meio Trioleína/Azul do Nilo A, a lipase do microrganismo promoverá a hidrólise do substrato, liberando ácidos graxos no meio e fazendo com que o meio de cultura tenha sua cor alterada de roxo (Figura 1.2A, resultado negativo) para azul claro (Figura 1.2B, resultado positivo). Por ser um corante indicador de pH, o Azul do Nilo A terá sua cor alterada por qualquer acidificação do meio, o que pode acarretar na observação de falsos positivos caso o microrganismo não produza lipases, mas produza qualquer outro tipo de metabólitos ácidos. A Rodamina B, por sua vez, interage especificamente com os ácidos graxos liberados da hidrólise do óleo de oliva quando da presença de lipases no meio, sendo observada uma mudança da coloração de rosa (Figura 1.2C, resultado negativo) para um laranja fluorescente (Figura 1.2D, resultado positivo) sob luz UV. Apesar do método de detecção de atividade lipolítica em meio seletivo Trioleína/Azul do Nilo A não ser específico, este permite melhor e mais fácil visualização dos halos de hidrólise formados, sendo complementar ao método em meio seletivo Óleo de Oliva/Rodamina B.

É possível observar que o grupo que mais se destacou nesta etapa de avaliação qualitativa da produção e secreção de lipases foi o dos fungos filamentosos (Tabela I.1). Os fungos compõem um grupo de organismos saprofitos com habilidade de adaptação em diferentes nichos ecológicos e são reconhecidos por apresentar e secretar um extenso conjunto de enzimas com capacidade de hidrólise de materiais orgânicos. Entretanto, é interessante observar através da análise dos dados apresentados na Tabela I.1, que o sucesso do isolamento de microrganismos secretores de lipase é influenciado não apenas pela classe de microrganismos, mas também pela origem do material de prospecção. Isto é evidenciado pelo fato de que foram encontrados mais microrganismos com resultados positivos nos testes qualitativos quando provenientes de ambientes ricos em lipídeos, como a torta de dendê (que contém óleo residual do processo de extração do óleo bruto) ou mesmo os próprios frutos de dendê. Quando selecionados os microrganismos endofíticos, 61,1% dos fungos filamentosos avaliados apresentaram resultados positivos nos testes qualitativos. Entretanto, para o mesmo grupo de microrganismos advindos da prospecção de frutos inteiros, esta fração foi de apenas 15,8%. Já para os microrganismos isolados dos cachos de dendê vazios (um resíduo bastante fibroso e que contém uma fração lipídica muito baixa), nenhum apresentou halo de hidrólise quando avaliado nos testes qualitativos. É possível, contudo, que apesar de não serem bons produtores e secretores de lipases, estes microrganismos estejam adaptados à secreção de outras enzimas hidrolíticas mais relacionadas ao tipo de ambiente que foram isolados, como celulasas e hemicelulasas.

Mesmo que alguns microrganismos tenham apresentado resultado positivo nos testes qualitativos, não significa que estes serão bons produtores de lipases quando cultivados por fermentação em estado sólido, pois os meios e as condições de cultivo, e conseqüente indução da produção destas enzimas são completamente distintas. Deste modo, foram selecionados 51 microrganismos para avaliação quanto à produção de lipases quando submetidos a fermentação em estado sólido utilizando torta de dendê como substrato/suporte para o cultivo. Os critérios utilizados para seleção destes microrganismos foram ter apresentado resultado positivo nos dois testes

qualitativos em meio seletivo ou ter apresentado um halo de hidrólise expressivo em pelo menos um dos testes e, no caso dos fungos filamentosos, ser esporulante, para que as condições de inóculo fossem padronizadas. Assim, foram selecionados e avaliados por ensaios enzimáticos para determinação de atividade lipolítica os seguintes fungos filamentosos: BDA 1, BDA 7.1, BDA 7.2, BDA 10, BDA 17, BDA 18, BDA 19, BDA 21, BDA 22, BDA 24, BDA-FI 4, BDA-FI 5, BDA-FI 6, BDA-FI 7, BDA-FI 8, BDA-FI 8.1, BDA-FI 11, BDA-FI 12, BDA-FI 15, BDA-FI 16, FPA 15, FPA 17, FPA 20, FPA 21, FPA 22, FPA 23, FPA 24, FPA 25, FPA 26, FPA 29 e FPA 30. Foram selecionadas e avaliadas, ainda, as bactérias LB 19, LB 25, LB-FI 1, LB-FI 2, LB-FI 31, LB-FI 37, LB-FI 41, LB-FI 42, LB-FI 49, LB-FI 52, LB-FI 58, LB-FI 59, LB-FI 61, TPA 5, TPA 6, TPA 7, CPA 3 e FPA 4 e as leveduras BDA-FI 23 e FPA 13.

Tabela I.1. Microrganismos isolados e resultados da triagem qualitativa em meios seletivos para prospecção de produtores de lipase.

	Resíduos da cadeia produtiva do dendê															Total
	Endofíticos			Fruto Inteiro			Cacho Vazio			Fibra de Prensagem			Fruto Inteiro			
	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF	B	L	FF	
Isolados	51	0	18	106	4	19	5	2	23	10	6	20	8	6	20	298
TO / AN	8	0	11	57	4	9	1	0	0	5	3	6	4	4	13	125
OO / ROD	1	0	15	0	0	6	1	0	0	3	0	1	1	0	8	36
Ambos Positivos	1	0	11	0	0	3	0	0	0	1	0	1	0	0	7	24
Positivos (%)	2,0	0	61,1	0	0	15,8	0	0	0	10,0	0	5,0	0	0	35,0	8,1

TO / AN: Apresentaram halo no meio Trioleína/Azul do Nilo A;

OO / ROD: Apresentaram halo no meio Óleo de Oliva/Rodamina B;

B: Bactérias; L: Leveduras; FF: Fungos Filamentosos.

Os extratos enzimáticos brutos e os sólidos fermentados relativos ao cultivo destes microrganismos em torta de dendê como substrato tiveram sua atividade lipolítica avaliada por meio dos métodos colorimétrico e titulométrico, respectivamente. Nenhum dos extratos enzimáticos brutos obtidos apresentou atividade lipolítica frente ao pNPP. Quando avaliados por meio do método

titulométrico, entretanto, apenas os sólidos fermentados relativos ao cultivo dos fungos filamentosos BDA 24, BDA-FI 7, BDA-FI 8.1, BDA-FI 11 e FPA 15 apresentaram atividade lipolítica frente ao óleo de oliva (Tabela I.2).

Tabela I.2. Atividade lipolítica dos sólidos fermentados obtidos do cultivo de microrganismos em torta de dendê por fermentação em estado sólido após 7 dias. Condições de cultivo: temperatura 30 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, óleo de oliva 5% (m/m) e 10⁷ esporos por grama de substrato. Método de análise: hidrólise do óleo de oliva (titulométrico).

Isolado	Atividade Lipolítica (U.gss⁻¹)
BDA 24	3,9 ± 0,9
BDA-FI 7	7,4 ± 0,1
BDA-FI 8.1	3,6 ± 0,2
BDA-FI 11	8,7 ± 0,4
FPA 15	10,1 ± 0,8

A ausência de atividade lipolítica nos extratos enzimáticos brutos frente à atividade lipolítica observada pelos sólidos fermentados demonstrou que apesar de estarem sendo produzidas, as lipases não estavam sendo eficientemente extraídas dos sólidos fermentados apenas com a incubação destes em solução salina. De fato, por se tratarem de enzimas com atuação em uma interface hidrofóbica-hidrofílica (especialmente no caso das reações de hidrólise, como no caso dos ensaios empregados), é possível que as lipases estivessem permanecendo adsorvidas aos sólidos fermentados e não pudessem ser liberadas em solução apenas com o tratamento utilizado. De fato, Bastida (1998) mostrou que as lipases são capazes de adsorver fortemente a superfícies hidrofóbicas através de bolsões hidrofóbicos localizados em torno do sítio ativo da enzima e da “tampa”, promovendo a formação da enzima em sua conformação aberta com atividades e estabilidades aumentadas. Assim, com relação aos resultados encontrados, sugere-se que as enzimas poderiam estar adsorvidas aos sólidos fermentados em uma conformação de “tampa aberta” que poderia facilitar a catálise, mas dificultar a desorção das superfícies hidrofóbicas dos substratos/suportes

utilizados na fermentação. Assim, decidiu-se por avaliar a adição de surfactantes ao processo de obtenção dos extratos enzimáticos brutos.

Considerando os cinco fungos filamentosos para os quais foi observada alguma atividade lipolítica decorrente do cultivo em torta de dendê, estabeleceu-se uma nova etapa de cultivos por fermentação em estado sólido agora visando avaliar o potencial de outros substratos, como o farelo de trigo, pois este tem sido reportado como um bom substrato indutor da expressão e secreção de lipases. Sendo assim, definiram-se cultivos consistindo de três combinações de substratos distintas: farelo de trigo, torta de dendê e uma mistura do farelo de trigo com a torta de dendê na proporção de 1:1, mantendo-se o restante das condições de cultivo conforme os experimentos anteriores. Contudo, conforme descrito anteriormente, para a etapa de obtenção do extrato enzimático bruto definiu-se um novo método de extração, substituindo a solução salina por solução B do ensaio de *p*NPP (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0, goma arábica 1,11 g.L⁻¹ e Triton X-100 4,44 g.L⁻¹).

Após proceder para os cultivos e ensaios conforme descrito no item 2.7.1, verificou-se que a extração utilizando Triton X-100 possibilitou a obtenção de extratos enzimáticos brutos com atividade lipolítica frente ao *p*NPP. Observou-se, ainda, que as condições de cultivo com farelo de trigo se sobressaíram em relação às demais avaliadas (Tabela I.3). Quando cultivados em torta de dendê como substrato, os fungos apresentaram uma atividade lipolítica muito inferior às outras condições de cultivo. Já com o uso da mistura de substratos, a atividade lipolítica observada foi intermediária à obtida pelas outras condições, provavelmente devido à presença do farelo de trigo em menor quantidade. Em relação ao fungo filamentoso BDA-FI 11 não foi observada atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos frente ao *p*NPP para nenhuma das condições de cultivo avaliadas. Já para o fungo filamentoso FPA 15, não foi possível quantificar a atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos devido à coloração escura destes, tornando-os incompatíveis com o método de detecção empregado. Assim, determinou-se a continuação das análises com os três fungos filamentosos apresentados.

Tabela I.3. Atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos do cultivo dos fungos BDA 24, BDA-FI 7 e BDA-FI 8.1 por fermentação em estado sólido em diferentes substratos após 7 dias. Condições de cultivo: temperatura 30 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, óleo de oliva 5% (m/m) e 10⁷ esporos por grama de substrato. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Isolado	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)		
	Farelo de Trigo	Farelo de Trigo:Torta de Dendê 1:1	Torta de Dendê
BDA 24	18,5 ± 0,9	9,6 ± 1,0	n.d.
BDA-FI 7	49,4 ± 2,0	23,7 ± 2,1	0,7 ± 0,1
BDA-FI 8.1	12,0 ± 0,9	9,1 ± 0,7	0,6 ± 0,0

n.d.: não detectada

Ainda como forma de selecionar um microrganismo para dar continuidade ao trabalho, as lipases obtidas do cultivo dos fungos filamentosos BDA 24, BDA-FI 7 e BDA-FI 8.1 em farelo de trigo foram aplicadas à síntese de biodiesel. Duas abordagens foram avaliadas. Para a primeira, o extrato enzimático bruto liofilizado (EBL) foi adicionado ao meio reacional como biocatalisador para a transesterificação de óleo de soja e etanol em ésteres etílicos de ácidos graxos (FAEE). Para a segunda abordagem, os sólidos fermentados liofilizados (SFL) foram utilizados como biocatalisadores. Quando avaliadas as alíquotas de 120 h das reações com SFL por cromatografia em camada delgada (CCD), observou-se um destaque do fungo BDA-FI 7 quanto ao tamanho das manchas de ésteres etílicos e diminuição da intensidade das manchas relativas à porção de triacilgliceróis (Figura I.3). Para as reações conduzidas com EBL, entretanto, não foi observada produção de ésteres etílicos, sendo possível que nos SFL estas estejam estabilizadas e protegidas da ação desnaturante do etanol.

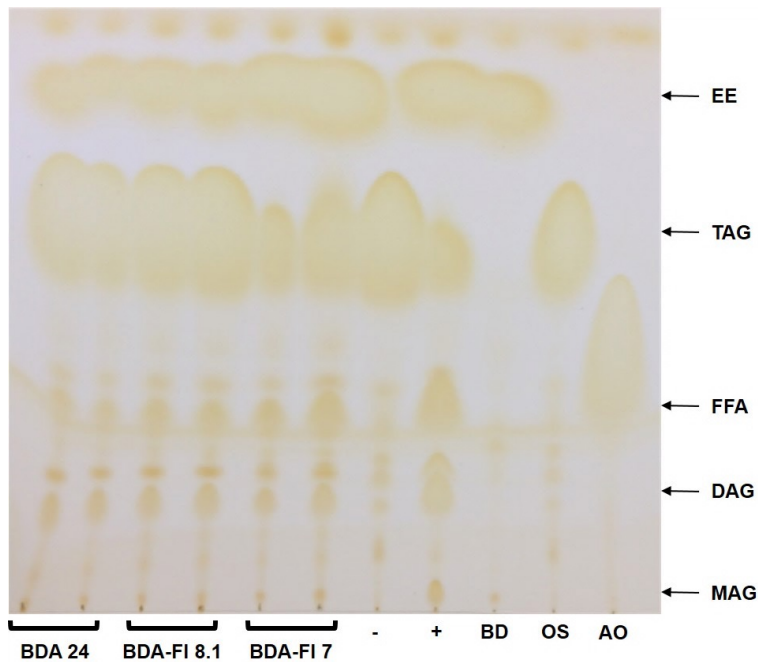


Figura I.3. Análise por cromatografia em camada delgada das amostras obtidas da reação de síntese de biodiesel com o uso de sólidos fermentados. Tempo de reação: 120 h. EE: Ésteres Etilícos (biodiesel); TAG: Triacilgliceróis; DAG: Diacilgliceróis; MAG: Monoacilgliceróis; FFA: Ácidos Graxos Livres; - : controle negativo (sem adição de enzima); + : controle positivo (com adição de Amano Lipase de *Burkholderia cepacia*); BD: Biodiesel; OS: Óleo de Soja; e AO: Ácido Oléico.

Além da análise qualitativa por CCD, o teor de FAEE obtido nas reações de transesterificação utilizando SFL foi quantificado por cromatografia gasosa. Para as reações utilizando SFL foram obtidos os teores de FAEE de $14,1 \pm 1,8\%$ para o cultivo de BDA 24, $26,9 \pm 1,2\%$ para o cultivo de BDA-FI 7 e $15,4 \pm 1,0\%$ para o cultivo de BDA-FI 8.1.

Entre os microrganismos avaliados, o fungo filamentoso BDA-FI 7 foi notavelmente o melhor produtor de lipase exibindo uma atividade lipolítica 2,7 vezes maior frente ao *pNPP* do que o segundo melhor produtor de lipase quando cultivado em farelo de trigo como substrato. Quando comparada a valores encontrados na literatura, esta atividade lipolítica ainda é inferior a diversas atividades relatadas para condições de ensaio similares, como no trabalho publicado por Veerabhadrapa e colaboradores (2014), que encontrou uma atividade de 1288 U.gss^{-1} (frente ao *pNPP*) no extrato enzimático obtido do cultivo de *Aspergillus versicolor* por FES sobre torta de semente de pinhão

manso. Já Mahapatra e colaboradores (2010), encontraram uma atividade mais próxima ao presente trabalho, tendo alcançando um valor de 77 U.gss⁻¹ (frente ao pNPP) no extrato enzimático obtido do cultivo de *Rhizopus oligosporus* por FES sobre farelo de trigo e óleo de mahua.

Entretanto, a presente atividade lipolítica de 49,4 ± 2,0 U.gss⁻¹ pode ser considerada bastante razoável diante de diversos trabalhos que relataram atividades inferiores. Oliveira e colaboradores (2013) encontraram uma atividade de 5 U.gss⁻¹ (frente ao pNPP) no extrato enzimático obtido do cultivo de *Fusarium* sp. por FES sobre farinha de crambe. Ramírez e colaboradores (2008), por sua vez, encontraram uma atividade de 1,5 U.gss⁻¹ (frente ao pNPP) no extrato enzimático obtido do cultivo de *Aspergillus* sp. por FES sobre bagaço de cana e polpa de café.

Com a quantificação do teor de ésteres presentes em cada amostra pode-se observar uma vez mais o destaque do fungo BDA-FI 7 em relação aos outros fungos avaliados, tendo este atingido um teor de FAEE 1,7 vezes maior do que o segundo melhor teor obtido. Desta forma, sabendo que o fungo em questão era capaz de produzir lipases quando cultivado por fermentação em estado sólido em farelo de trigo e que estas lipases eram capazes de atuar na síntese de ésteres etílicos, este fungo filamentososo foi selecionado para a etapa de otimização da produção de lipases por fermentação em estado sólido.

3.2 Otimização da produção de lipases por *Aspergillus* sp. BDA-FI 7

Por meio da análise da sequência de ITS obtida, o fungo filamentososo BDA-FI 7 foi identificado como pertencente ao gênero *Aspergillus*. Entretanto, não foi possível uma identificação ao nível de espécie, sendo necessárias ainda outras análises de sequências de DNA, como dos genes da calmodulina e da β-tubulina.

Para iniciar a etapa de otimização da produção de lipases por *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) foram realizados uma série de cultivos preliminares de forma a selecionar e reduzir as variáveis de cultivo a serem avaliadas pelo planejamento experimental.

Inicialmente, avaliou-se o tipo de solução utilizada para umedecer o farelo de trigo nos cultivos por FES. Deste modo, foram comparadas as produções de lipase por *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) quando crescido em farelo de trigo umedecido com meio de cultura (Alberton *et al.*, 2009) ou tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹, sendo ambas as soluções tamponadas em pH 7,0. Concomitantemente, foi avaliado se uma mistura de farelo de trigo e torta de dendê (na proporção 9:1) seria capaz de aumentar a produção da lipase. Os resultados dessa análise estão demonstrados abaixo na Figura I.4.

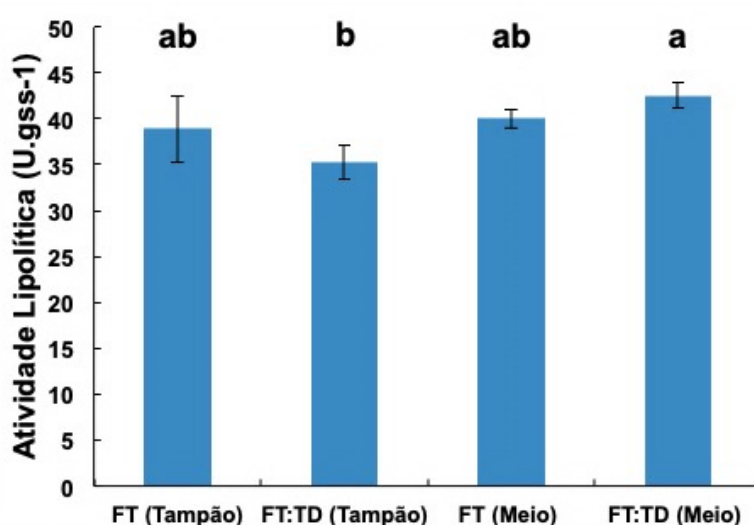


Figura I.4. Cultivos de *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) por FES em diferentes substratos/suportes e soluções umidificadoras. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). FT: cultivo em farelo de trigo; FT:TD: cultivo em mistura de farelo de trigo e torta de dendê (9:1). Condições de cultivo: temperatura 30 °C, umidade 65%, óleo de oliva 5% (m/m) e 10⁷ esporos por grama de substrato. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

De acordo com a análise estatística (Tukey), observa-se que o grupo amostral relativo ao cultivo na mistura de farelo de trigo com torta de dendê umedecida com tampão é diferente do grupo amostral relativo ao cultivo na mistura de farelo de trigo com torta de dendê umedecida com meio sintético. Os demais grupos são estatisticamente iguais entre si quando comparados dois a dois. Deste modo, visando facilitar o preparo e baratear a produção das lipases, já que o uso de um meio de cultura sintético exige uma variedade e

quantidade de reagentes maior, optou-se pela condição de cultivo umedecida com tampão fosfato de sódio. Optou-se, ainda, pelo uso do substrato/suporte contendo apenas farelo de trigo, pois este apresenta composição muito mais homogênea do que a torta de dendê, que é muito fibrosa e de granulometria heterogênea.

Avaliou-se, ainda, se havia diferença entre umedecer o farelo de trigo com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} pH 7,0 ou com água destilada. Concomitantemente, analisou-se a utilização do óleo de soja como indutor ao invés do óleo de oliva. Os resultados das atividades lipolíticas obtidas destes cultivos estão demonstrados abaixo na Figura I.5.

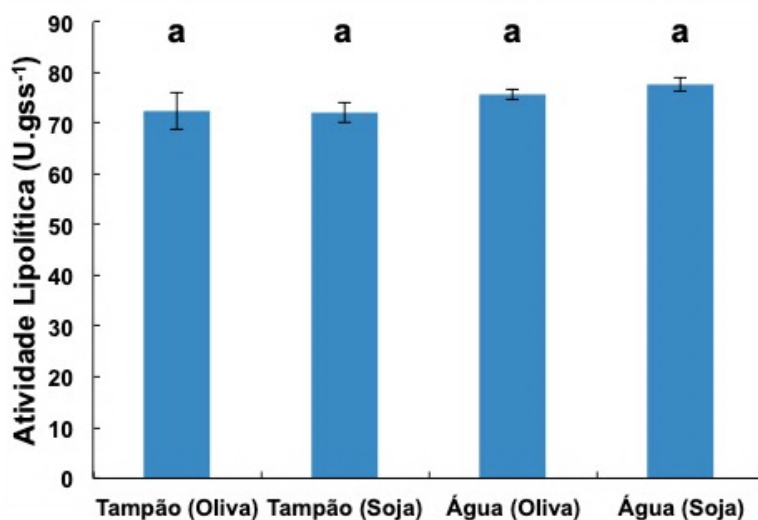


Figura I.5. Cultivos de *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) por FES em farelo de trigo e diferentes soluções umidificadoras e óleos indutores. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). Condições de cultivo: temperatura 30 °C, umidade 65%, óleo indutor 5% (m/m) e 10^7 esporos por grama de substrato. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Por meio da análise estatística (Tukey), observa-se que todos os grupos são iguais entre si quando comparados dois a dois. Deste modo, não importa se o substrato para o cultivo do fungo foi umedecido com tampão ou com água destilada. Tampouco importa se o indutor utilizado foi o óleo de oliva ou o óleo de soja. Contudo, apesar da estatística mostrar que umedecer com água ou com tampão tem o mesmo efeito sob a produção da lipase, optou-se por

manter o tampão como solução umidificadora. Embora a utilização da água destilada em detrimento da utilização do tampão pudesse baratear o custo final do produto obtido, não seria possível estabelecer diferentes valores de pH para novos cultivos, impossibilitando o uso desta variável em experimentos subsequentes. Em relação ao óleo indutor, optou-se pelo cultivo acrescido de óleo de soja, já que este apresenta menor custo e maior abundância de produção nacional.

A fim de verificar a influência do pH inicial de cultivo sobre a produção de lipases pelo fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) cultivado por FES, realizaram-se dois novos cultivos. Fixaram-se as condições de cultivo com temperatura de 30 °C e umidade de 45% e variou-se o valor de pH inicial em 5,5 e 7,5 considerando tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹. Para os cultivos em pH inicial de 5,5 e 7,5 obtiveram-se valores de atividade lipolítica de 14,3 ± 1,5 U.gss⁻¹ e 14,2 ± 0,2 U.gss⁻¹, respectivamente. Após avaliação por meio do teste de hipótese para igualdade de médias e variâncias estatisticamente iguais concluiu-se que a resposta de atividade lipolítica dos dois cultivos foi estatisticamente igual. Assim, sabendo que o cultivo do fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) em diferentes valores de pH inicial não resultou em diferença estatisticamente significativa, fixou-se o pH de cultivo em 7,0 para as próximas etapas de otimização da produção de lipases.

Determinados o substrato (farelo de trigo), a solução umidificadora (tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹), o óleo indutor (óleo de soja) e o valor de pH inicial a serem utilizados e baseando-se nos trabalhos da literatura de FES com fungos filamentosos (disponível no Anexo I), definiram-se as variáveis de estudo para o DCCR: temperatura, umidade e a quantidade de inóculo inicial. Desta forma, construiu-se uma matriz de experimentos contendo quatro réplicas do ponto central. Após os cultivos, a atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos foi obtida para três dias distintos (Tabela I.4)

As médias dos ensaios para cada dia de extração foram inseridas no software Statistica (v.12) e avaliadas considerando um nível de significância de 90% (p<0,1), gerando três modelos independentes para cada dia analisado (Figura I.6). Com base na análise estatística pode ser verificado que apenas as variáveis temperatura e umidade influenciaram significativamente a atividade

lipolítica dos extratos, independentemente do tempo de cultivo, sendo o tamanho do inóculo indiferente à resposta em atividade lipolítica. Os gráficos de valores observados *versus* valores preditos para 4, 7 e 10 dias de cultivo (Figuras I.6A, I.6C e I.6E) demonstram a robustez dos modelos apresentados em descrever o comportamento da produção de lipases pelo fungo em questão por meio de fermentação em estado sólido.

Tabela I.4. DCCR com variáveis reais e codificadas (entre parênteses) para otimização do cultivo de *Aspergillus sp.* (BDA-FI 7) por FES. Condições de cultivo: umedecido com tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ e óleo de soja 5% (m/m). Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

#	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ Umidade (%)	X ₃ Tamanho Inóculo (esporos/g)	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)		
				4 Dias	7 Dias	10 Dias
1	23,04 (-1)	49,05 (-1)	21,07x10 ⁶ (-1)	7,5 ± 0,1	14,6 ± 1,0	25,2 ± 0,7
2	23,04 (-1)	49,05 (-1)	79,93x10 ⁶ (1)	8,4 ± 0,4	20,1 ± 0,9	24,7 ± 0,2
3	23,04 (-1)	60,95 (1)	21,07x10 ⁶ (-1)	8,2 ± 0,2	20,3 ± 0,5	25,1 ± 0,6
4	23,04 (-1)	60,95 (1)	79,93x10 ⁶ (1)	11,8 ± 0,8	18,7 ± 0,6	35,5 ± 1,1
5	31,96 (1)	49,05 (-1)	21,07x10 ⁶ (-1)	27,8 ± 1,1	33,6 ± 1,7	43,2 ± 1,0
6	31,96 (1)	49,05 (-1)	79,93x10 ⁶ (1)	26,2 ± 0,4	47,0 ± 0,6	49,5 ± 0,7
7	31,96 (1)	60,95 (1)	21,07x10 ⁶ (-1)	38,2 ± 1,2	50,7 ± 2,3	60,2 ± 2,5
8	31,96 (1)	60,95 (1)	79,93x10 ⁶ (1)	39,7 ± 1,6	55,9 ± 2,4	56,7 ± 3,0
9	20 (-1,68)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	4,5 ± 0,3	10,8 ± 0,3	20,2 ± 0,3
10	35 (1,68)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	57,5 ± 0,7	47,0 ± 2,6	44,5 ± 0,8
11	27,5 (0)	45 (-1,68)	50,5x10 ⁶ (0)	18,1 ± 0,6	24,3 ± 1,1	39,0 ± 0,6
12	27,5 (0)	65 (1,68)	50,5x10 ⁶ (0)	18,7 ± 1,1	30,5 ± 0,9	39,4 ± 0,5
13	27,5 (0)	55 (0)	1x10 ⁶ (-1,68)	18,2 ± 0,5	28,8 ± 0,6	40,9 ± 0,5
14	27,5 (0)	55 (0)	100x10 ⁶ (1,68)	26,5 ± 0,3	31,7 ± 1,8	49,6 ± 1,7
15	27,5 (0)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	21,3	32,4	42,8
16	27,5 (0)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	22,8	41,1	49,6
17	27,5 (0)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	19,6	33,7	53,6
18	27,5 (0)	55 (0)	50,5x10 ⁶ (0)	18,4	33,9	55,8

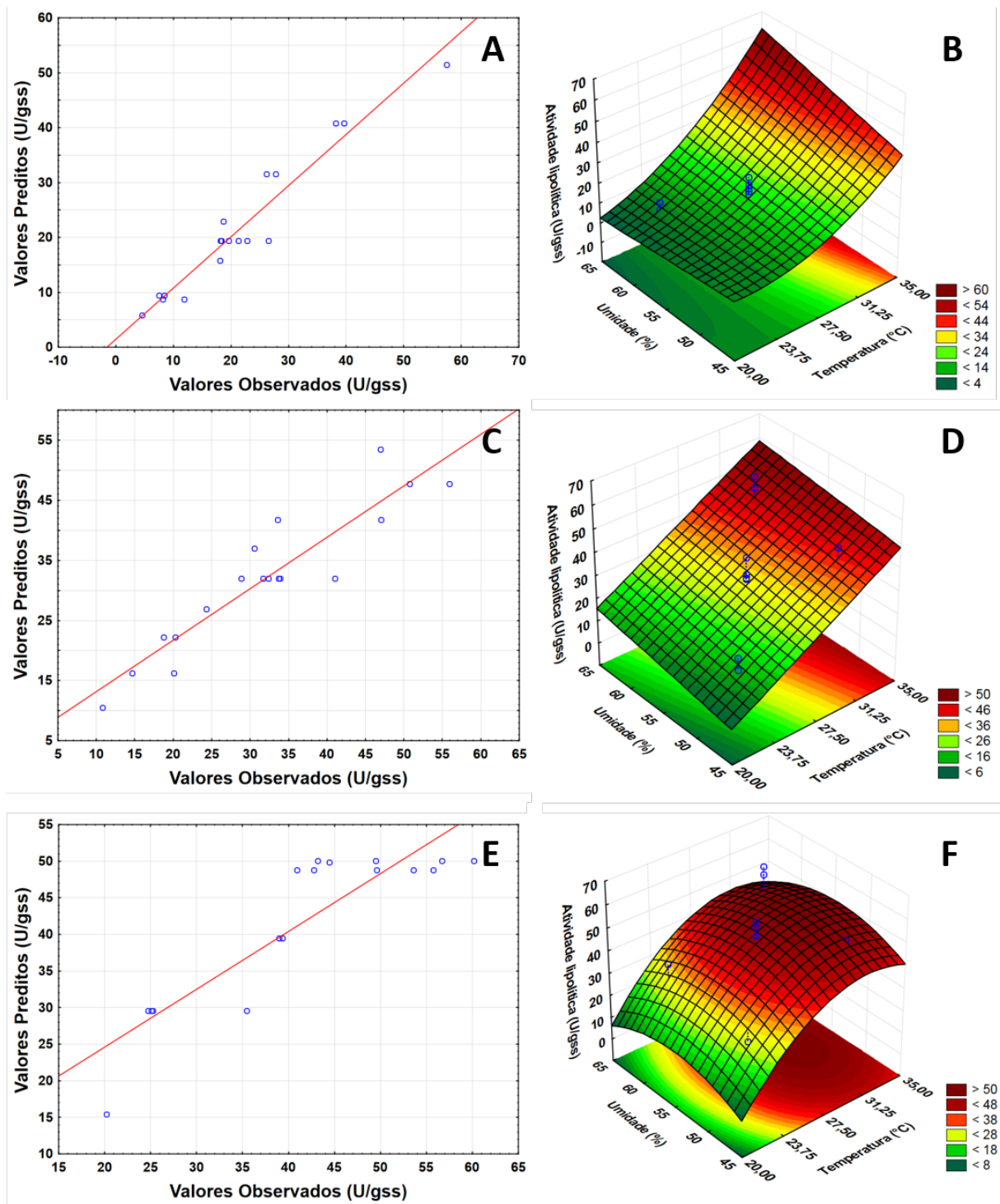


Figura I.6. Análise estatística do experimento de delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização da produção de lipases pelo fungo BDA-FI 7 por fermentação em estado sólido. A, C e E: Gráficos dos valores observados *versus* valores preditos com 4, 7 e 10 dias de cultivo, respectivamente; B, D e F: Superfícies de resposta para atividade lipolítica em função da temperatura e da umidade com 4, 7 e 10 dias de cultivo, respectivamente.

As funções que descrevem as atividades lipolíticas para as condições de 4, 7 e 10 dias de cultivo são apresentadas nas Equações 1, 2 e 3, respectivamente, com variáveis codificadas e considerando parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,1$).

$$\textit{Atividade lipolítica 4 dias} = 19,36 + 13,54.X_1 + 3,28.X_1^2 + 2,13.X_2 + 2,47.X_1.X_2$$

Equação (1)

$$\textit{Atividade lipolítica 7 dias} = 31,96 + 12,77.X_1 + 2,99.X_2$$

Equação (2)

$$\textit{Atividade lipolítica 10 dias} = 48,79 + 10,24.X_1 - 5,71.X_1^2 - 3,29.X_2^2$$

Equação (3)

A análise dos gráficos de superfície de resposta e funções obtidas permitiu verificar um potencial aumento de atividade lipolítica quando o cultivo ocorre em temperaturas e umidades mais elevadas por 4 e 7 dias, prevendo atividades de $61,9 \text{ U.gss}^{-1}$ e $58,4 \text{ U.gss}^{-1}$ respectivamente (Figuras I.6B e I.6D). Quando o cultivo se estende por 10 dias, entretanto, o modelo prevê uma pequena queda de atividade nos níveis axiais de temperatura e umidade, tendo uma condição ótima de cultivo a $31,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade de $58,5\%$ e prevendo uma atividade lipolítica de $53,3 \text{ U.gss}^{-1}$ (Figura I.6F). Os estudos de Godoy e colaboradores (2011) e Mofteh e colaboradores (2012) observaram que baixas umidades resultam em menor turgescência do substrato o que pode reduzir a acessibilidade de nutrientes pelo microrganismo, resultando em menor crescimento e produção de enzimas e metabólitos, o que pode explicar a preferência deste fungo por umidades mais altas. Entretanto, para o substrato farelo de trigo a maior umidade possível atingida sem que houvesse água livre no cultivo (condição determinante para caracterização de um cultivo por FES) foi de 65% , utilizada como ponto axial na análise realizada.

A análise de variância (ANOVA) indicou que o F calculado (F_{calc}) para as regressões foi maior do que o F tabelado (F_{tab}), indicando que os modelos foram significativos e satisfazem os requisitos para a construção de uma superfície de resposta. As relações de F ($F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$) para as regressões foram

de 14,3, 12,1 e 5,2 para os modelos de atividades lipolíticas com 4, 7 e 10 dias cultivo, respectivamente. O coeficiente de correlação (R^2) para os modelos foi de 93,3, 85,7 e 79,0%, respectivamente. Embora alguns coeficientes de correlação apresentados tenham sido baixos, a ANOVA aponta que os modelos são adequados para fins preditivos, já que as relações de $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$ obtidas foram superiores a 3, conforme recomendado por Box (1978). A ANOVA indicou, ainda, que o F_{calc} para as faltas de ajuste foi menor do que seus respectivos F_{tab} , demonstrando que as faltas de ajuste não foram significativas e fazendo com que os modelos sejam adequados. Entretanto, o critério para um modelo ser considerado bem ajustado (relação $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}} < 0,1$) não foi satisfeito. Isto acontece porque o valor do erro puro foi baixo (o que indica boa reprodutibilidade dos dados obtidos) e, sendo este valor baixo, são observados um aumento nos valores de F_{calc} . Desta forma, o que se tem é uma falsa ideia de um ajuste ruim, quando na verdade ele só não é excelente. Portanto, de acordo com a ANOVA, pode-se concluir que os modelos se encaixam bem aos dados experimentais e que é possível utilizar técnicas de otimização das respostas nas faixas avaliadas.

As funções que codificam os modelos em questão foram utilizadas para determinar os pontos de máxima atividade e os cultivos do fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) em tais condições foram realizados para validação experimental dos modelos propostos (Tabela I.5).

Tabela I.5. Resultado dos cultivos de validação dos modelos obtidos pelo DCCR para otimização da produção de lipases por FES. Condições de cultivo 4 e 7 dias: temperatura 35 °C ($X_1= 1,68$), umidade 65% ($X_2= 1,68$) e 10^7 esporos por grama de substrato ($X_3= -1,38$). Condições de cultivo 10 dias: temperatura 31,5 °C ($X_1= 0,90$), umidade 55% ($X_2= 0$) e $5,05 \times 10^7$ esporos por grama de substrato ($X_3= 0$). Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Cultivo de Validação	Atividade Experimental (U.gss ⁻¹)	Atividade Predita (U.gss ⁻¹)	Erro Absoluto (U.gss ⁻¹)	Erro Relativo (%)
4 dias	60,8 ± 2,5	61,9	-1,1	1,8
7 dias	68,5 ± 5,4	58,4	10,1	14,7
10 dias	54,9 ± 2,0	53,3	1,6	2,9

Devido à boa correlação entre os valores preditos, os resultados empíricos obtidos e as análises de variância dos modelos gerados, os modelos foram considerados válidos para descrever o comportamento da produção de lipases pelo fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) quando cultivado em farelo de trigo por fermentação em estado sólido.

Após ter sido padronizado o cultivo do fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) para otimizar a produção de lipases por FES ter sido avaliada por meio do uso do método colorimétrico (*p*NPP), procedeu-se com a avaliação destas mesmas amostras frente a substratos naturais, como triacilgliceróis e óleos. A grande vantagem do ensaio realizado com *p*NPP está no fato de ser um experimento simples e rápido, sendo ideal para acompanhar a produção da lipase ou fazer medições rápidas. Entretanto, não sendo possível a avaliação da atividade lipolítica frente a substratos naturais por meio do método colorimétrico, foi necessária a utilização do método titulométrico. Assim, foi avaliada a capacidade hidrolítica tanto dos extratos enzimáticos brutos quanto dos sólidos fermentados obtidos frente aos substratos tributirina (C4), tricaprilina (C8), trioleína (C18:1 Δ^9) e o óleo de oliva extra virgem. Todos estes foram utilizados na forma de uma emulsão com goma arábica, como descrito na sessão materiais e métodos. As amostras utilizadas para determinação da atividade lipolítica foram referentes ao cultivo de 7 dias do experimento de validação do DCCR e foram as mesmas utilizadas para a reação de síntese de ésteres etílicos (descrita na próxima sessão). As atividades obtidas para cada substrato estão apresentadas na Tabela I.6.

Avaliando os resultados obtidos, observa-se que as lipases de *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) apresentaram atividade lipolítica preferencial frente a substratos de cadeias carbônicas menores, como a tributirina e a tricaprilina. Não foi detectada atividade em trioleína nem em óleo de oliva para o extrato enzimático bruto do cultivo deste fungo. Os sólidos fermentados apresentaram de forma geral uma atividade lipolítica menor do que a do extrato. Entretanto, estes apresentaram atividade lipolítica frente a substratos de cadeias carbônicas maiores que o extrato enzimático bruto não apresentou, como o óleo de oliva. Assim, é possível que a etapa de extração enzimática não seja

totalmente eficiente e parte das lipases permaneça adsorvida aos sólidos fermentados mesmo após o processo de extração.

Tabela I.6. Atividades lipolíticas referentes ao cultivo de 7 dias do fungo *Aspergillus* sp. (BDA-FI 7) frente a substratos naturais. Condições de cultivo: temperatura 35 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, óleo de soja 5% (m/m) e 10⁷ esporos por grama de substrato. Método de análise: titulométrico.

Substrato	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)	
	Extrato Enzimático	Sólidos Fermentados
	Bruto	Liofilizados
Tributirina (C4:0)	50,5 ± 0,2	30,8 ± 1,0
Tricaprilina (C8:0)	39,5 ± 1,1	12,9 ± 0,8
Trioleína (C18:1, Δ ⁹)	n.d.	7,7 ± 0,7
Óleo de Oliva	n.d.	5,2 ± 0,4

n.d.: não detectada

Como observado por Salum (2010), as lipases podem ter muitas vezes atividade lipolítica maior frente a substratos de cadeia carbônicas menores, que seriam considerados substratos de esterases, e menor frente a substratos de cadeias carbônicas maiores. Contudo, as esterases só catalisam a hidrólise de cadeias carbônicas pequenas, sendo incapazes de catalisar reações com substratos de cadeias carbônicas longas. Frente aos resultados anteriormente obtidos para a reação de síntese (Figura I.3), tem-se que os sólidos fermentados e o extrato enzimático obtidos possuem atividade de transesterificação. Esta reação havia sido realizada utilizando óleo de soja (composto em sua maioria por triacilgliceróis compostos de ácido oléico) como substrato, o que demonstra a atuação de lipases verdadeiras produzidas pelo fungo durante o cultivo. A atividade lipolítica frente ao pNPP (cadeia de 16 carbonos), mesmo se tratando de um substrato sintético, também aponta para a existência de lipases verdadeiras no extrato enzimático bruto produzido. De acordo com relatos de trabalhos da literatura, não existe uma relação direta entre as atividades de hidrólise e de síntese (Silva *et al.*, 2011; Kotogán *et al.*, 2014), embora uma alta atividade de hidrólise possa sugerir uma alta atividade sintética.

3.3 Síntese de Ésteres Etílicos com SFL de *Aspergillus sp.* (BDA-FI 7)

Quando avaliados (item 3.1), os sólidos fermentados liofilizados obtidos do cultivo do fungo filamentoso *Aspergillus sp.* (BDA-FI 7) foram capazes de catalisar a conversão de óleo de soja e etanol em ésteres etílicos. Já o extrato enzimático liofilizado, obtido do mesmo cultivo, não foi capaz de catalisar a produção dos ésteres. Em ambos os casos a reação havia sido conduzida no solvente orgânico n-heptano. Assim, avaliou-se a possibilidade de utilização dos sólidos fermentados e extratos enzimáticos brutos otimizados como catalisadores em reação de transesterificação conduzida sem solvente orgânico no meio reacional. O uso do meio reacional sem solvente confere uma vantagem comercial, já que reduz os custos e as particularidades de manuseio e purificação do produto final. Deste modo, com exceção da adição do solvente, a reação ocorreu nas mesmas condições testadas anteriormente, sendo utilizados para cada reação um total de 90 U.

Transcorridas 120 h de reação, avaliaram-se as alíquotas produzidas. É possível ver que as lipases produzidas foram capazes de catalisar a conversão de óleo de soja e etanol em ésteres etílicos mesmo sem a presença de solvente orgânico tanto na forma de SFL quanto na forma de EBL (Figura I.7A). Pode-se verificar pelo tamanho das bandas, entretanto, que a utilização de SFL foi mais eficiente do que a utilização de EBL. Essa é uma grande vantagem, pois os sólidos fermentados requerem menos manipulação para serem obtidos e ainda podem ser resgatados e adicionados em um novo meio reacional para um novo ciclo de síntese.

É possível que os sólidos fermentados tenham sido mais eficientes, pois as lipases podem estar adsorvidas de tal forma que estabilize a conformação tridimensional das mesmas protegendo-as ou até de forma que a catálise seja favorecida (Bastida *et al.*, 1998).

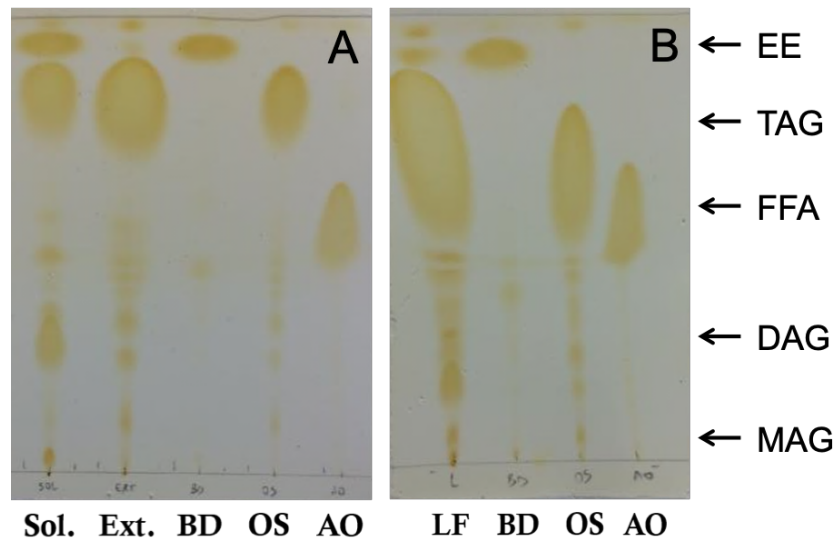


Figura I.7. Análise por cromatografia em camada delgada das amostras obtidas da reação de transesterificação com o uso de sólidos fermentados e extrato enzimático bruto conduzida em frascos do tipo *erlenmeyer* (A) e com o uso de sólidos fermentados conduzida em reator de leito fixo (B). Condições de reação: razão molar óleo de soja:álcool etílico 1:3, temperatura de 37 °C, agitação de 120 rpm e 120 h de reação. Sol.: Reação com o uso de SFL; Ext.: Reação com o uso de EBL; LF: Reação conduzida em reator de leito fixo; EE: Ésteres Etílicos (biodiesel); TAG: Triacilgliceróis; DAG: Diacilgliceróis; MAG: Monoacilgliceróis; FFA: Ácidos Graxos Livres; BD: Biodiesel Etílico de Óleo de Soja; OS: Óleo de Soja; e AO: Ácido Oléico.

Concomitantemente, avaliou-se a capacidade do SFL ser utilizado para a reação de transesterificação em reator de leito fixo. Para isso, utilizou-se uma coluna cromatográfica encamisada que foi empacotada com SFL, por onde o meio reacional circulou. Assim como para a reação conduzida em *erlenmeyer*, o sólido fermentado utilizado na reação em leito fixo também foi capaz de catalisar a conversão de óleo de soja e etanol em ésteres etílicos (Figura I.7B). Ao comparar qualitativamente as manchas obtidas nas CCDs este método parece ter sido menos eficiente em relação ao uso do sólido fermentado para reação em *erlenmeyer*. Entretanto, esta técnica de reação em leito fixo ainda precisa ser aperfeiçoada e novos testes ainda precisarão ser realizados com esse tipo de reator.

4. Conclusões

Dentre os 298 microrganismos isolados, 51 foram selecionados na triagem em meios seletivos. Quando cultivados por fermentação em estado sólido, apenas os fungos filamentosos BDA-24, BDA-FI 7, BDA-FI 8.1, BDA-FI 11 e FPA 15 apresentaram atividade lipolítica. Destes, o fungo filamentoso BDA-FI 7 (*Aspergillus* sp.) foi o mais promissor, apresentando atividade lipolítica frente ao *p*NPP de $68,5 \pm 5,4$ U.gss⁻¹. Após otimização do cultivo de BDA-FI 7 em farelo de trigo, tanto os sólidos fermentados quanto o extrato enzimático obtidos apresentaram atividade lipolítica em substratos de cadeia longa, evidenciando a produção de lipases verdadeiras. A capacidade de transesterificar óleo de soja em monoalquil ésteres demonstra o potencial de aplicação das lipases produzidas em processos enzimáticos de síntese de biodiesel.

CAPÍTULO II – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS FRUTOS DE DENDÊ (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.) E SEU POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das bactérias epifíticas associadas aos frutos de dendê que fossem produtoras de lipase, selecioná-las para uma triagem por fermentação em estado sólido para produção de lipases e sua aplica-las para a síntese de biodiesel.

2. Metodologia

2.1 Coleta de frutos de dendê

Os frutos do dendê (*E. guineensis* Jacq.) foram coletados na estação seca (agosto de 2013) na estação experimental da Embrapa Cerrados (S153609.1 / W0474338,6 / 1045 m de altitude). Frutos saudáveis e maduros foram coletados assepticamente de três plantas de quatro diferentes cultivares de dendê (BRS C2528, BRS C2301, BRS C1001 e BRS C2501) cultivadas em um experimento de irrigação de longo prazo na Embrapa Cerrados. As 12 amostras de frutos foram colocadas em um saco estéril e transportadas para o laboratório da Embrapa Agroenergia, e armazenadas em temperatura ambiente até o isolamento bacteriano no mesmo dia.

2.2 Isolamento de bactérias epifíticas

Cinco frutos de tamanho, peso e estágio de maturação aproximadamente semelhantes foram selecionados de cada amostra para o isolamento de bactérias epifíticas. O procedimento para isolamento e purificação das culturas ocorreu conforme descrito no item 2.3.1 do Capítulo I, desconsiderando as etapas de lavagem do fruto.

Todos os microrganismos isolados foram estocadas e armazenados na coleção “Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorefinarias”

(CMMAABio) da Embrapa Agroenergia e foram registrados junto ao SISGEN, sob número A5F079B para acesso ao patrimônio genético.

2.3 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos

As bactérias isoladas foram avaliadas em meios seletivos Trioleína/Azul do Nilo A, Óleo de oliva/Rodamina B e Tween 20 conforme procedimento descrito no item 2.4 do Capítulo I. Após quatro dias de incubação a 28 °C, o Índice Enzimático (EI) foi calculado como a razão entre o diâmetro médio do halo e o diâmetro médio do crescimento da colônia. Todos os testes foram realizados em duplicata e a média e o desvio padrão foram calculados no Excel.

2.4 Identificação dos isolados por sequenciamento 16S

As bactérias inicialmente isoladas foram cultivadas em meio LB por 18 h a 28 °C, tiveram seu DNA genômico extraído e utilizado para amplificação do DNA ribossômico 16S. Os *primers* utilizados foram P0(27f) (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e R1378 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') para amplificar uma região de 1,5 kb, de acordo com Lane (1991). Cada reação foi preparada para um volume final de 50 µL e continha 0,2 mmol.L⁻¹ de dNTP, 2,0 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 5 µL tampão 10x (Life Technologies), 2 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies), 0,2 µmol.L⁻¹ de cada *primer* e 1 µL de DNA genômico apropriadamente diluído. Os parâmetros do ciclo térmico foram os seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 62,5 °C por 60 segundos, 72 °C por 60 segundos e extensão final de 72 °C por 10 min. Após amplificação por PCR, os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (1%) e visualizados sob UV por intercalação com brometo de etídio. Os produtos de amplificação foram então purificados com o *PureLink® PCR Purification Kit* (Life Technologies) e sequenciados. As sequências foram analisadas no CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com>) para os parâmetros de qualidade e obtenção das sequências consenso, que foram, então, comparadas com o GenBank Database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) e com o Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

2.5 Fermentação em Estado Sólido

As bactérias selecionadas por métodos qualitativos foram cultivadas por fermentação em estado sólido para produção de lipases.

Após retiradas as bactérias do estoque de ultracongelamento, inoculadas em meio LBA e decorrido o tempo de crescimento até a obtenção de colônias puras, selecionou-se uma colônia para o inóculo em meio LB caldo. Este meio líquido (denominado pré-inóculo) foi condicionado a uma temperatura de 28°C e agitação de 180 rpm. Acompanhou-se a densidade ótica dos cultivos de pré-inóculo até que esta atingisse o valor estabelecido de absorvância de 0,8.

Os cultivos foram feitos conforme descrição no item 2.5 do Capítulo I considerando tampão fosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ pH 7,0 como solução umidificadora. Após etapa de extração, o sobrenadante (extrato enzimático bruto) foi utilizado nas análises de determinação de atividade lipolítica.

2.6 Ensaio enzimáticos para determinação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos foi determinada conforme descrito nos itens 2.7.1 (método colorimétrico) e 2.7.2 (método titulométrico) do capítulo I.

2.7 Cinética de produção de lipases

Avaliou-se o perfil de produção de lipases ao longo de diferentes dias de cultivo para a bactéria selecionada. Assim, foram analisadas amostras de extratos enzimáticos brutos obtidos de cultivos independentes a cada 24 h por um período de seis dias. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata.

2.8 Síntese de Ésteres Etílicos

O extrato enzimático bruto e os sólidos fermentados correspondentes ao cultivo da bactéria selecionada foram submetidos a uma etapa de liofilização e, em seguida, à reação de síntese de ésteres etílicos (transesterificação). Esta foi realizada com razão óleo:álcool 1:3. Para isto, foram utilizados 2 mmol de óleo de soja refinado (Soya) e 6 mmol de álcool etílico (Sigma). Ao meio

reacional, adicionou-se água destilada 0,5% m/m (Salum *et al*, 2010) e solvente orgânico (*n*-heptano) até totalizar um volume de 10 mL por reação. Cada reação foi preparada individualmente em frascos do tipo erlenmeyer vedados com rolha. A cada reação foram adicionados 1 g de sólido fermentado ou o equivalente a 10 mL de extrato enzimático bruto liofilizado (referente à extração de 1 g de sólido fermentado). Os erlenmeyers contendo meio reacional foram, então, incubados a 37°C por seis dias com agitação de 120 rpm e o meio reacional foi coletado para análise de teor de ésteres por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

2.9 Quantificação de ésteres etílicos por HPLC

As amostras foram diluídas em uma mistura de 2-propanol/hexano 5:4 (v/v) para uma concentração de 5 mg/mL e os ésteres etílicos foram cromatograficamente quantificados em um sistema de HPLC injetando 10 µL em coluna de fase reversa C₁₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) mantida a 40 °C em metanol. A eluição foi realizada em um gradiente com fluxo constante de 1 mL.min⁻¹ da seguinte forma: 100% de metanol em 0 min, 50% de metanol e 50% de 2-propanol/hexano 5:4 (v/v) num gradiente isocrático por 10 min e depois mantido até 20 min. Os ésteres etílicos foram detectados em um detector de fotodiodos (PDA) configurado em 205 nm e quantificados por meio de um cálculo comparando a soma das áreas de pico ésteres metílicos como padrão (Carvalho, 2012).

2.10 Montagem e anotação do genoma

O DNA genômico de *B. gladioli* (gDNA) foi isolado e enviado para sequenciamento por meio de duas estratégias: inserções curtas (Illumina Hiseq2000 extremidade emparelhada 2x150 pb) e pares de pares (Illumina Hiseq2000 extremidade emparelhada 2x100 pb com um tamanho médio de inserção de 3000 pb). O software FastQC (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) foi usado para avaliar a qualidade das bibliotecas antes e depois do corte. Para corte de qualidade e filtragem de sequência, o software NGS QC Toolkit (versão 2.3.3, www.nipgr.res.in/ngsqctoolkit.html) foi empregado para remover resíduos de adaptadores de sequenciamento e leituras de baixa qualidade.

A montagem foi realizada usando AllPaths-LG (software.broadinstitute.org/allpaths-lg) usando uma cobertura máxima de 100X para cada biblioteca. A anotação estrutural e funcional do genoma foi realizada usando PROKKA v1.13 (Seemann, 2014). A anotação funcional dos genes previstos foi feita usando InterProScan v.5.21.60 com PFAM v29 incorporado, Gene Ontology, Interpro e SignalP-4.1. Os CAZymes foram previstos com base no pipeline dbCAN v6.0 HMMs (csbl.bmb.uga.edu/dbCAN). A integridade do genoma foi acessada com BUSCO v4.1.4 usando o conjunto de dados central Burkholderiales (Simao et al., 2015). A montagem e anotação completas do genoma foram depositadas nos bancos DDBJ, EMBL e Genbank sob o acesso QODE00000000.

A análise filogenética foi realizada usando genes ortólogos conservados, de cópia única, identificados em 15 genomas bacterianos recuperados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foram utilizados 200 genes ortólogos de cópia única identificados em cada montagem individual do genoma com Proteinortho5 (Lechner et al., 2011), alinhados usando MAFFT v7.245 (Kato & Standley, 2013) e filtrados com Trimal usando a opção -automated1 (Capella-Gutierrez et al., 2009). Para obter a árvore, os alinhamentos de cada ortólogo de cópia única foram concatenados e usados como entrada para inferência filogenética de probabilidade máxima com fasttree v2 (Price et al., 2010).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e seleção de bactérias produtoras de lipase

A partir da coleta de frutos de dendê maduros, foram isoladas 664 bactérias que estavam associadas a estes frutos de forma epifítica. A análise dos dados mostra que a contagem bacteriana total (CFU.mL⁻¹) é influenciada não apenas pelo meio de cultura utilizado no procedimento de isolamento, mas também pela cultivar de dendê de origem.

Cada bactéria foi repicada e rastreada para produção de lipase usando meios seletivos contendo azeite de oliva, trioleína ou Tween 20. Os maiores

valores de Índice Enzimático (IE) foram 7,63 para trioleína, 3,33 para azeite e 9,50 para Tween 20 . As bactérias que apresentaram um IE superior a 1 foram agrupadas em 8 classes fenotípicas apresentadas na Tabela II.1.

Tabela II.1. Classes fenotípicas de 664 bactérias epifíticas isoladas de frutos de dendê de acordo com seu perfil de hidrólise para diferentes substratos.

Classe fenotípica	Número de isolados	Porcentagem de isolados (%)
Trioleína (TO)	37	5,57
Azeite de Oliva (AO)	33	4,97
Tween 20 (T20)	123	18,52
AO + TO	2	0,30
AO + T20	1	0,15
TO + T20	220	33,13
AO + TO + T20	7	1,05
Nenhuma	241	36,29

A trioleína é um triacilglicerol composto por três unidades de ácido oleico (C18:1) e, portanto, como substrato de cadeia longa, é apenas hidrolisado por lipases verdadeiras. O IE para este substrato variou de 1,06 a 7,63.

O azeite de oliva é uma mistura complexa de triacilgliceróis de cadeia longa composta principalmente de ácidos oleico (C18:1), linoléico (C18:2) e palmítico (C16:0). Por ser mais barato quando comparado aos triacilgliceróis purificados, o azeite de oliva é um substrato ideal para a seleção de cepas secretoras de lipase. Uma vez secretadas, essas enzimas catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos que são capazes de complexar com a rodamina B presente no meio e formar um halo fluorescente quando colocados sob luz ultravioleta. O IE para este substrato variou de 1,05 a 3,33.

O Tween 20 é um surfactante não iônico derivado do ácido láurico (C12:0) e, portanto, pode funcionar como um substrato sintético para lipases. Quando secretadas para o meio, as lipases hidrolisam este surfactante, liberando ácidos láuricos, que reagem com os íons de cálcio do meio para

formar sais de cálcio insolúveis que criam uma zona de opacidade ao redor da colônia. O IE para este substrato variou de 1,06 a 9,5.

Após esta triagem qualitativa, 47 bactérias foram selecionadas com base não só nos índices enzimáticos obtidos, mas também na origem da linhagem no isolamento de frutos de dendzeiros. Os critérios de origem da linhagem foram a variedade da palmeira de dendê de origem e meio de cultura utilizado no processo de isolamento (dados não mostrados, referentes a um período anterior ao início do doutorado).

3.2 Seleção de bactérias por fermentação em estado sólido

Partindo das 47 bactérias selecionadas, procedeu-se com a produção de lipases através do cultivo destas linhagens por fermentação em estado sólido (FES). Como o objetivo inicial da triagem era encontrar uma bactéria que se destacasse quanto à produção de lipases, os cultivos foram realizados até encontrar uma linhagem que se enquadrasse nesta categoria. Assim, das 47 bactérias, 18 foram cultivadas através de fermentação em estado sólido em farelo de trigo e testadas quanto à atividade de lipase. A identificação das 18 bactérias cultivadas por fermentação em estado sólido é apresentada na Tabela II.2.

Tabela II.2. Identificação do gene 16s das 18 bactérias avaliadas através da Fermentação no Estado Sólido. a: Índice enzimático = média diâmetro halo / média diâmetro colônia; TO = Trioleína; AO = Azeite de Oliva; T20 = Tween 20.

#	Identificação da espécie	Código de isolamento	Índice Enzimático ^a		
			TO	AO	T20
1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 93 (45) D9	-	2.00	-
2	Não identificada	CNPAE 93 (67) F7	-	2.00	-
3	<i>Isoptericola</i> sp.	CNPAE 94 (102) A6	-	1.38	-
4	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 94 (131) C11	-	1.11	7.24
5	Enterobacteriaceae	CNPAE 95 (210) B6	1.23	-	4.47
6	Enterobacteriaceae	CNPAE 96 (319) C7	5.09	-	1.58
7	Não identificada	CNPAE 96 (369) G9	5.63	-	1.58
8	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 97 (385) A1	2.15	-	1.22
9	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 97 (418) C10	1.55	-	7.73
10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 97 (420) C12	1.94	-	2.04
11	<i>Serratia nematodiphila</i>	CNPAE 97 (432) D12	2.39	-	5.14
12	Não identificada	CNPAE 97 (435) E3	1.76	-	-
13	Não identificada	CNPAE 98 (483) A3	2.09	-	-
14	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 98 (559) G7	1.36	1.70	2.85
15	<i>Bacillus thuringiensis</i>	CNPAE 98 (570) H6	2.24	-	-
16	<i>Burkholderia gladioli</i>	CNPAE 99 (579) A3	3.88	1.38	1.61
17	Não identificada	CNPAE 99 (630) E6	2.57	-	-
18	<i>Serratia marcescens</i>	CNPAE 99 (642) F6	1.45	1.05	3.20

Após a avaliação dos extratos obtidos do cultivo das 18 bactérias, apenas os extratos brutos obtidos do cultivo de CNPAE 97 (385) A1, CNPAE 97 (418) C10, CNPAE 97 (420) C12, CNPAE 98 (559) G7, CNPAE 98 (570) H6 e CNPAE 99 (579) A3 exibiram atividade lipolítica (Tabela II.3).

Tabela II.3. Atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos do cultivo de linhagens selecionadas de bactérias epifíticas por FES. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 30 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0, óleo de oliva 5% (m/m), 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ 0,8 e quatro dias de cultivo. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Código da Linhagem	Identificação da Espécie	Atividade Lipolítica (U.gss⁻¹)
CNPAE 97 (385) A1	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,2 ± 0,2
CNPAE 97 (418) C10	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,2 ± 0,2
CNPAE 97 (420) C12	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,9 ± 0,2
CNPAE 98 (559) G7	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,0 ± 0,1
CNPAE 98 (570) H6	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,8 ± 0,2
CNPAE 99 (579) A3	<i>Burkholderia gladioli</i>	476,7 ± 26,0

Com exceção de CNPAE 99 (579) A3, todo o restante das linhagens obtidas que apresentaram atividade lipolítica foram classificadas como *Bacillus thuringiensis*. Existem poucos trabalhos publicados na literatura que relacionam a utilização de espécies de *Bacillus* para a produção de lipases por FES. Alkan e colaboradores (2007) cultivaram *Bacillus coagulans* em resíduos de melão acrescidos de óleo de oliva, resultando em uma atividade de 161,9 U.gss⁻¹ frente ao pNPP. No estudo realizado por Sangeetha e colaboradores (2011), a FES em torta de semente de *Pongamia pinnata* com *Bacillus pumilus* resultou em uma expressiva atividade de 1974 U.gss⁻¹ frente ao pNPP. Já para o estudo de Esakkiraj e colaboradores (2012), o cultivo de *Bacillus altitudinis* em resíduos de pescado (garoupa vermelha) acrescidos de óleo de neem produziu um extrato com atividade de 7,6 U.gss⁻¹ frente ao pNPA (acetato de *p*-nitrofenila). Contudo, quando comparadas a estes trabalhos, as atividades lipolíticas encontradas para as linhagens de *Bacillus* isoladas por este trabalho são inferiores, mas demonstram o potencial dos frutos de dendê como uma fonte prolífica de linhagens bacterianas com potencial biotecnológico.

Entre os microrganismos avaliados, CNPAE 99 (579) A3 (denominado a partir de agora como *Burkholderia gladioli* BRM58833) foi notavelmente o melhor produtor de lipase exibindo uma atividade lipolítica 214 vezes maior do que o segundo melhor produtor de lipase encontrado. Esta atividade é bastante expressiva quando comparada a outras atividades lipolíticas relatadas na literatura obtidas por cepas bacterianas cultivadas por fermentação em estado sólido. Por exemplo, Salum (2010) obteve uma atividade frente ao pNPP de 234 U.gss⁻¹ com o cultivo de *Burkholderia cepacia* em uma mistura de farinha de girassol e bagaço de cana-de-açúcar. No entanto, quando Mahanta (2008) cultivou uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* em torta de semente de pinhão-manso, foi encontrada uma atividade lipolítica (pNPP) ainda mais expressiva, de 625 U.gss⁻¹.

Burkholderia gladioli é uma bactéria Gram-negativa que pode ser encontrada em diversos nichos ecológicos. Inicialmente, classificada como *Pseudomonas marginata*, esta bactéria é conhecida por ser um fitopatógeno causador de manchas foliares, escurecimento da bainha das folhas e podridão dos grãos em cultivares de cebola, arroz, gladiolos e íris (Stoyanova *et al.*, 2007). Mais recentemente, entretanto, *B. gladioli* foi classificada como um patógeno oportunista em humanos, tendo sido relatados casos de infecção em pacientes imunocomprometidos (Zanotti *et al.*, 2018). Com relação à investigação de carboxilesterases produzidas por *B. gladioli*, pouco tem sido feito. Apenas algumas publicações relacionam o estudo de esterases (Ivancic *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011) e, mais recentemente, o trabalho de Zhu e colaboradores (2019) descreve a produção e caracterização de uma lipase verdadeira obtida por fermentação submersa.

Devido ao potencial demonstrado por esta linhagem para a produção de lipases, ao fato de que as espécies de *Burkholderia* são reconhecidas como eficientes bactérias secretoras de lipase e considerando existem poucas publicações a respeito de lipases de *Burkholderia gladioli*, a linhagem *B. gladioli* BRM58833 foi selecionada para avaliações subsequentes.

Assim, foi realizada uma cinética de produção de lipases, sendo a atividade lipolítica resultante do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 por FES avaliada a cada 24 h durante seis dias de cultivo (Figura II.1). É possível notar uma tendência de aumento da atividade lipolítica ao longo do tempo de cultivo. Ainda, com a análise de variância de Tukey ($p < 0,05$) observa-se que o tempo de cultivo de 120 h é estatisticamente igual ao tempo de 144 h. Conclui-se, portanto, que após 120 h de cultivo a atividade lipolítica atingiu um máximo de produção, estabilizando a seguir.

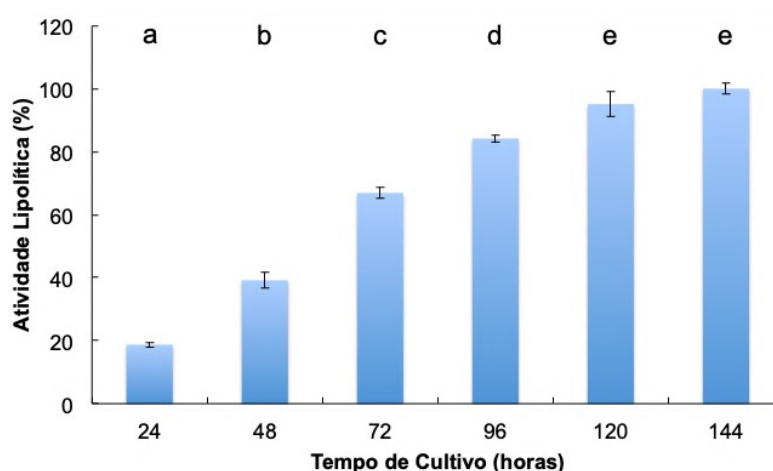


Figura II.1. Atividade lipolítica relativa de extratos brutos obtidos do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 por FES por seis dias. As letras representam diferença estatística entre as atividades lipolíticas de cada tempo de cultivo (Tukey, $p < 0,05$). Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 30 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0, óleo de oliva 5% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ 0,8. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Para avaliar a estabilidade do extrato e se as lipases permaneceriam funcionais após estocagem, a atividade lipolítica do extrato bruto foi medida após 20 dias de armazenamento. A análise mostrou que o extrato bruto retinha 99% de sua atividade quando armazenado a 4 °C, revelando um extrato que não apenas é rico em atividade lipolítica, mas também notavelmente estável.

3.3 Hidrólise de substratos naturais

A atividade lipolítica do extrato enzimático bruto de *B. gladioli* BRM58833 foi medida para quatro diferentes substratos naturais (tributirina, tricaprilina, trioleína e óleo de oliva) pelo método titulométrico. Os resultados são apresentados na Tabela II.4.

Tabela II.4. Atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 frente a diferentes substratos naturais. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 30 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0, óleo de oliva 5% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ 0,8. Método de análise: titulométrico.

Substrato	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)
Tributirina C4:0	214,5 ± 6,5
Tricaprilina C8:0	196,5 ± 13,8
Trioleína C18:1 (Δ^9)	61,6 ± 0,9
Óleo de Oliva	68,0 ± 0,7

O extrato enzimático bruto apresentou maiores atividades lipolíticas frente a substratos de cadeias mais curtas, como a tributirina e a tricaprilina. Contudo, a detecção de atividade lipolítica frente a substratos de cadeias carbônicas maiores (como a trioleína e o óleo de oliva) comprova a existência de lipases verdadeiras no extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *B. gladioli* BRM58833. O comportamento de lipases verdadeiras apresentarem maior atividade lipolítica em substratos de cadeias carbônicas curtas já foi observado por outros autores e não a descaracteriza como lipase verdadeira, já que esterases não apresentam reatividade com substratos de cadeia carbônica longa. Fernandes e colaboradores (2007) obtiveram lipases do cultivo de *Burkholderia cepacia* em farelo de milho e alcançou atividades lipolíticas de 84 U.gss⁻¹ frente a tributirina enquanto para a trioleína o mesmo preparado enzimático obteve apenas 42 U.gss⁻¹. Já em estudo realizado por Alberton e colaboradores (2010), as lipases de *Rhizopus microsporus* obtidas do cultivo

por FES em bagaço de cana e farelo de semente de girassol alcançaram atividade de $50 \pm 5 \text{ U.gss}^{-1}$ em tributirina, $51 \pm 4 \text{ U.gss}^{-1}$ em tricaprilina e $26 \pm 2 \text{ U.gss}^{-1}$ para trioleína, evidenciando mais uma vez o mesmo fenômeno. Assim, esta maior reatividade pode ser considerada apenas uma característica de cada extrato produzido.

3.4 Síntese de ésteres etílicos

Em caráter de teste preliminar, avaliou-se a aplicabilidade das lipases produzidas pelo cultivo de *B. gladioli* BRM58833 por FES para a síntese de ésteres etílicos. Duas abordagens foram avaliadas. Na primeira, o extrato enzimático bruto liofilizado foi adicionado ao meio reacional como biocatalisador para a transesterificação de óleo de soja e etanol em ésteres etílicos (FAEE). Para a segunda abordagem, no entanto, os sólidos fermentados liofilizados foram usados como biocatalisadores. Após condução da reação de transesterificação (item 2.7), os FAEE foram quantificados resultando em teores de FAEE de $77,6 \pm 0,1\%$ e $95,6 \pm 0,3\%$ em 144 h de reação para o uso do extrato enzimático bruto e dos sólidos fermentados, respectivamente. Bastida (1998) mostrou que as lipases adsorvem fortemente a interfaces hidrofóbicas através de bolsões hidrofóbicos que circundam o sítio ativo da enzima e a "tampa", produzindo uma estrutura aberta com atividade e estabilidade aumentadas. Assim, com relação aos resultados encontrados, propôs-se que a enzima poderia estar adsorvida aos sólidos fermentados em uma conformação de "tampa aberta" que poderia facilitar a catálise ou mesmo estabilizar a conformação tridimensional da enzima protegendo-a da ação desnaturante do etanol. Teores elevados de ésteres etílicos também foram encontrados por outros autores após reação de transesterificação em cossolvente utilizando sólidos fermentados liofilizados (SFL). Fernandes e colaboradores (2007), por exemplo, utilizaram SFL do cultivo de *Burkholderia cepacia* em reação com óleo de milho e álcool etílico (razão molar 1:6) conduzida em *n*-heptano e encontraram um teor de ésteres de 94,7% após 120 h. Já no trabalho de Liu e colaboradores (2014), o uso dos SFL delipidados obtidos do cultivo de *Burkholderia cenocepacia* resultou em um teor de FAEE de 91,3% após 96 h de reação de transesterificação de óleo de soja e álcool etílico conduzida em *tert*-butanol.

3.5 Análise do genoma de *B. gladioli* BRM58833

A bactéria *Burkholderia gladioli* pode ser encontrada em uma ampla gama de nichos ecológicos, incluindo a rizosfera vegetal, solo, água e ambientes urbanos. Uma das razões pelas quais essas bactérias prosperam em ecossistemas tão diversos é relacionada à plasticidade e a adaptabilidade metabólica derivada de seus genomas. O objetivo do sequenciamento do genoma de *B. gladioli* BRM58833 foi identificar especialmente genes envolvidos no catabolismo de lipídeos, como esterases e lipases.

Segundo Demirdag e colaboradores (2020), a espécie *Burkholderia gladioli*, apesar de considerada um patógeno oportunista, não é relacionada como pertencente ao complexo *Burkholderia cepacia* (*bcc*, em inglês), sendo classificada como uma espécie independente que pode ser distinguida de outros membros deste complexo por suas propriedades bioquímicas e fisiológicas. Filogeneticamente, *B. gladioli* BRM58833 está mais próxima à espécie *B. glumae* (Figura II.2).

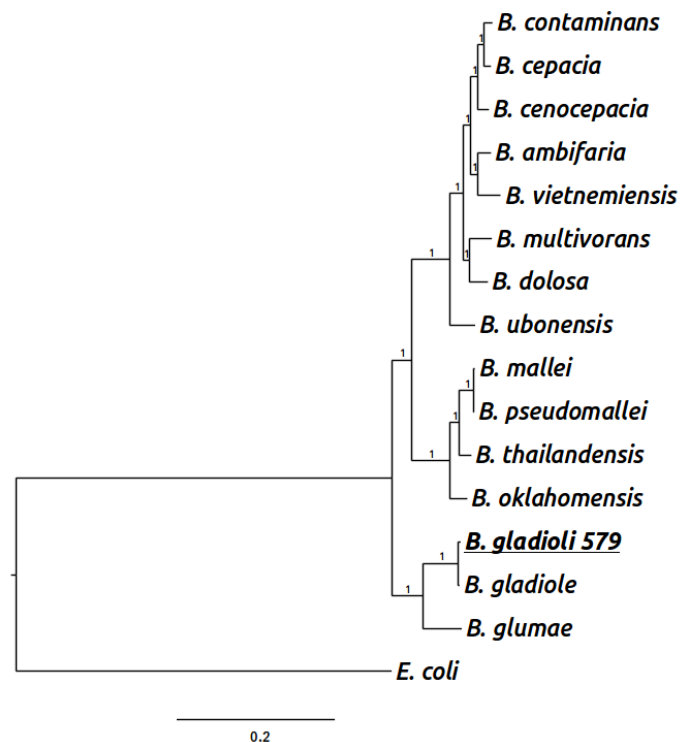


Figura II.2. Análise filogenética.

O genoma de *B. gladioli* BRM58833 foi sequenciado em uma abordagem de sequenciamento shotgun de genoma completo baseada em Illumina, fornecendo 25.650.531 leituras emparelhadas de 2x150 pb com um tamanho de inserção aproximado de 350 pb combinado com 15.515 leituras emparelhadas com um tamanho de inserção aproximado de 3.000 pb. As leituras de sequência adquiridas foram montadas em 12 *scaffolds* (contendo dois plasmídeos potenciais) com um comprimento total de 8,05 Mb e conteúdo de GC de 68,1% (Tabela II.5). O tamanho do genoma está na mesma faixa de outros genomas de *Burkholderia*, e parece perto de seu tamanho final, mostrando 98% da análise de completude usando o conjunto de dados para Burkholderiales, grupo em que está inserida filogeneticamente. A modelagem de genes rendeu 6.739 sequências codificantes, 53 tRNA e 257 pseudogenes. De acordo com SignalP4.1, 735 proteínas são potencialmente secretadas, incluindo 250 CAZymes, entre elas 25 esterases de carboidratos. A sequência completa do genoma foi depositada nas bases de dados DDBJ, EMBL e Genbank sob o número de acesso QODE00000000.

Tabela II.5. Anotação do genoma de *B. gladioli* BRM58833 e estatísticas de montagem.

Características do genoma	Valor
Número de <i>scaffolds</i>	12
Tamanho do genoma (Mb)	8.05
Conteúdo GC	68.1%
L50 (Mb)	2
N50	1.05
Maior <i>scaffold</i>	2.46
Genes codificantes para proteínas	6,739
Proteínas com Pfam	85.8%
Completude BUSCO	98%

Quanto à busca por enzimas envolvidas no catabolismo de lipídeos, foram identificadas pelo menos nove carboxilesterases de cópia única com possível atividade lipolítica, considerando tanto esterases quanto lipases

verdadeiras. É importante destacar que a expressão de cada uma destas enzimas pode variar conforme as condições de cultivo e estímulos à transcrição de cada gene. Desta forma, faz-se necessária uma avaliação experimental do proteoma/secretoma resultante de cada condição de cultivo. De forma especial, destaca-se a presença da lipase BGL (WP_165652138.1), já que esta apresenta todas as características descritas na literatura para lipases verdadeiras de *Burkholderia*, como um tamanho característico de 36 kDa, presença de peptídeo sinal sinalizando a secreção da enzima e posicionamento genômico *upstream* ao gene de sua chaperona específica (foldase), necessária à produção de uma lipase com atividade catalítica funcional.

4. Conclusões

Conforme os resultados obtidos, as bactérias associadas aos frutos de dendê constituem uma fonte prolífica de linhagens com potencial para a produção de lipases. Dentre as 664 bactérias isoladas, apenas os extratos brutos obtidos do cultivo de linhagens de *Bacillus thurigiensis* e *Burkholderia gladioli* exibiram atividade lipolítica, sendo esta última a mais promissora, com atividade lipolítica frente ao pNPP de $476,7 \pm 26,0 \text{ U.gss}^{-1}$. O estudo do genoma de *B. gladioli* BRM58833 demonstrou a existência de um conjunto de genes codificadores para carboxilesterases englobando tanto esterases quanto lipases verdadeiras. A atividade lipolítica frente ao substrato óleo de oliva (cadeia longa) demonstrou experimentalmente que o extrato enzimático obtido possui lipases verdadeiras em sua composição. Após a condução da reação de transesterificação em *n*-heptano, foram quantificados os teores de ésteres etílicos de $77,6 \pm 0,1\%$ e $95,6 \pm 0,3\%$ para o uso do extrato enzimático bruto e dos sólidos fermentados, respectivamente. A grande variedade de esterases e lipases presentes no genoma de *B. gladioli* BRM58833, podendo estas ser exploradas mais a fundo em estudos seguintes. Deste modo, fica evidente o potencial de produção de lipases por *B. gladioli* BRM58833.

CAPÍTULO III – PRODUÇÃO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LIPASE ALCALINA DE *BURKHOLDERIA GLADIOLI* BRM58833

Referente ao trabalho MARTINS, P.A.; PACHECO, T.F.; CAMARGO, B.R.; DE MARCO, J.L.; SALUM, T.F.C. Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain, **Prep. Biochem. Biotechnol.** v. 51, p. 1-10. 2021 (Anexo II).

1. Objetivos

Sabendo que uma maior produtividade de lipases pode ser alcançada através da otimização do cultivo, este trabalho buscou explorar o potencial lipolítico de *B. gladioli* BRM58833. Assim, otimizou-se a produção e extração de lipases por fermentação em estado sólido e caracterizou-se o *pool* de enzimas obtido, de modo que este possa ser destinado a uma aplicação compatível.

2. Metodologia

2.1 Microrganismo

A bactéria *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi previamente isolada de frutos de dendê e preservada em meio Luria Bertani (LB) com 20% (m/v) de glicerol a -80 °C. A cepa está preservada na Coleção de Microorganismos e Microalgas Aplicadas à Agroenergia e Biorrefinarias, Embrapa Agroenergia, Brasília, Brasil.

2.2 Curva de crescimento de *B. gladioli* BRM58833

Para determinar qual a faixa de densidade ótica (OD) referente à fase exponencial de crescimento da bactéria a fim de determinar a quantidade de inóculo e padronizar os experimentos subsequentes, realizou-se uma curva de

crescimento. Assim, a OD dos cultivos em meio LB caldo foi acompanhada através de leituras com comprimento de onda de 600 nm no espectrofotômetro a cada 2 h.

2.3 Fermentação em estado sólido (FES)

Avaliou-se a capacidade da bactéria *B. gladioli* BRM58833 em produzir lipases quando submetida ao crescimento em farelo de trigo como substrato para fermentação em estado sólido. O procedimento ocorreu conforme descrito no item 2.5 do Capítulo I, considerando tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 7,0 ou meio de cultura sintético (K₂HPO₄ 0,7 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 0,4 g.L⁻¹; KNO₃ 3,54 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,01 g.L⁻¹; NaCl 0,38 g.L⁻¹; extrato de levedura 5 g.L⁻¹; pH 7,0) como soluções umificadoras.

2.3.1 Otimização das condições de cultivo

Para a otimização das condições de cultivo com objetivo de aumentar a produção de lipases, foi conduzido um planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR). Este foi originalmente descrito por Box e Wilson (1951) e utilizado com sucesso para otimização de processos por Myers e Montgomery (2002). Foram considerados cinco níveis e cinco variáveis de cultivo independentes na análise. O experimento foi conduzido conforme matriz gerada com cinco variáveis e três repetições do ponto central sendo cada condição cultivada em triplicata totalizando 129 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,78. As variáveis independentes consideradas foram: temperatura variando de 20 °C a 40 °C (X₁), pH inicial de cultivo variando de 4,7 a 8,3 (X₂), umidade variando de 40% a 65% (X₃), quantidade de indutor adicionado variando de 1 a 10% m/m (X₄) e OD do inóculo inicial variando de 0,2 a 1,5 (X₅). Para obtenção das diferentes ODs, o pre-inóculo foi cultivado até OD₆₀₀ de 0,5 (correspondente à fase exponencial de crescimento) e concentrado por centrifugação. De forma a adicionar diferentes quantidades de inóculo, mas com as células na mesma fase de crescimento, o pré-inóculo concentrado teve sua OD ajustada com o mesmo tampão utilizado para umedecer o cultivo considerando um volume final de 1 mL por frasco. As faixas de estudo para cada variável foram determinadas conforme dados da literatura para cultivo de bactérias por fermentação em

estado sólido e também conforme limitações do substrato. A produção de lipases foi avaliada após cinco dias de cultivo conforme atividade de hidrólise do pNPP (método colorimétrico).

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi feita utilizando o *software* Statistica (v. 12.0). Foi considerado um nível de significância de 90% ($p < 0,1$) devido à variabilidade dos bioprocessos (Haaland 1989). Para validar as previsões do modelo, novas fermentações foram realizadas sob condições previstas pelos modelos.

2.4 Otimização das condições de extração das lipases

Inicialmente, avaliou-se a utilização de diferentes soluções extratoras: 1) água destilada (AD); 2) solução salina de cloreto de sódio 2% (SS); 3) tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TP); 4) solução de Tween-20 0,2% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (T20); 5) solução de Tween-80 0,2% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (T80); 6) solução de Triton X-100 0,4% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TX100); e 7) solução de Triton X-100 0,4% e goma arábica 0,1% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TXG).

Após determinação da melhor solução de extração, otimizaram-se as condições de preparo e utilização da solução de extração por meio de planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR). Foram considerados cinco níveis e cinco variáveis de cultivo independentes na análise. O experimento foi conduzido conforme matriz gerada com cinco variáveis e três repetições do ponto central, totalizando 45 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,78. As variáveis independentes consideradas foram: temperatura variando de 5 °C a 35 °C (X_1), força iônica do tampão variando de 10 a 110 mmol.L⁻¹ (X_2), pH do tampão de extração variando de 5,0 a 9,0 (X_3), quantidade de Triton X-100 adicionado variando de 0 a 1% m/v (X_4) e quantidade de goma arábica adicionada variando de 0,02 a 0,04% m/v (X_5). A extração de lipases foi avaliada conforme atividade lipolítica determinada pela hidrólise do pNPP (método colorimétrico).

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi feita utilizando o *software* Statistica (v. 12.0). Foi considerado um nível de significância de 90% ($p < 0,1$) devido à variabilidade dos bioprocessos (Haaland 1989). Para validar as previsões do modelo, novas fermentações foram realizadas sob condições previstas pelos modelos.

2.5 Cinética de produção de lipases

Considerando as condições otimizadas de cultivo e de extração das lipases, avaliou-se o perfil de produção de lipases ao longo de diferentes dias de cultivo. Assim, foram analisadas amostras de extratos enzimáticos brutos obtidos de cultivos independentes a cada 24 h, por um período de oito dias. Todas as avaliações foram realizadas em triplicata de cultivo e análise.

2.6 Ensaios enzimáticos para determinação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos foi determinada conforme descrito nos itens 2.7.1 (método colorimétrico) e 2.7.2 (método titulométrico) do capítulo I. Para o método colorimétrico, entretanto, foi considerado o uso de microplacas ao invés de cubetas para a leitura.

2.7 Análise do secretoma de *B. gladioli* BRM58833 por LC-MS/MS

Uma amostra de 50 μg de extrato enzimático bruto foi precipitada com acetona resfriada 20% a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ durante a noite. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 30 min e lavada duas vezes com acetona pura gelada. Em seguida, o sedimento obtido foi suspenso em tampão bicarbonato de amônio $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. As proteínas foram então reduzidas com $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ditioneitol (DTT) e alquiladas com $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ iodoacetamida, ambos por 30 min a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e protegidos da luz. As proteínas foram então submetidas à digestão com $1\text{ }\mu\text{g}$ de tripsina por 20 h a $37\text{ }^\circ\text{C}$ e sob agitação de 800 rpm. Em seguida, a proteólise foi interrompida com a adição de ácido fórmico (AF) 1% (v/v). Os peptídeos resultantes foram carregados em uma resina C18 Poros R2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) pré-equilibrada em ácido trifluoroacético 0,1% (v/v), eluída por lavagem sequencial com acetonitrila (ACN) 50% e 70% , secos a vácuo e diluídos em AF 0,1% (v/v) antes da análise por LC-MS. Os peptídeos obtidos foram carregados em um sistema

EASY-nanoLC 1000 LC (Thermo Fischer Scientific) equipado com uma coluna Reprosil AQ-Pur C18 3 μm (Dr. Maish, Ammerbuch, Alemanha). Solvente A [ACN 5% (v/v) e AF 0,1% (v/v)] e solvente B [ACN 95% (v/v) e AF 0,1% (v/v)] foram usados em um gradiente de 5 - 45% B em 55 min e 45 - 95% B em 10 min com uma taxa de fluxo de 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os peptídios foram eluídos e injetados num espectrômetro de massa Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific) através de ionização por electrospray. Os espectros foram adquiridos no método de aquisição dependente de dados (15 principais). Os dados de MS foram adquiridos usando o valor alvo AGC de $3\cdot 10^6$, temperatura capilar definida para 250 °C, faixa de varredura de 375-2000 m/z com resolução de 70000 e tempo máximo de injeção de 50 ms, enquanto os dados de MS/MS foram adquiridos usando AGC de $1\cdot 10^5$, tempo máximo de injeção de 50 ms, uma largura de janela de isolamento de 3 Da, NCE de 30% e resolução de MS/MS de 17500. Os softwares Proteome Discoverer v2.1 (Thermo Fisher Scientific) e Sequest HT foram usados para analisar os dados LC-MS usando o genoma de *B. gladioli* (acesso NCBI: QODE00000000) como o banco de dados considerando carbamidometilação de cisteínas como modificações fixas e oxidação de metionina e acetilação de extremidades N-terminais como modificações variáveis. Os espectros principais tinham um filtro de tolerância de 0,05 Da e espectros de MS *in tandem* de 10 ppm. O ponto de corte da *False Discovery Rate* foi de 0,01 e a sequência de aminoácidos mínima foi definida para 6 AA.

2.8 Avaliação do efeito da temperatura e pH

A avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade lipolítica do extrato enzimático bruto foi realizada por meio do método tradicional, com comparação ponto a ponto, utilizando o método titulométrico e trioleína como substrato.

Para a determinação do pH de melhor atuação das lipases obtidas, fixou-se a temperatura em 37 °C e foram avaliados os valores de pH em 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 em tampão Tris-HCl 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Para determinação da temperatura com maior atividade de atuação das lipases obtidas, fixou-se o pH em 9,0 em tampão Tris-HCl 2,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e foram avaliadas as temperaturas

de 32; 37; 40; 45; 50; 55; 60; 65 e 70 °C.

2.9 Efeito do comprimento da cadeia carbônica do substrato

O extrato enzimático bruto obtido teve sua atividade lipolítica avaliada frente a substratos sintéticos e naturais com diferentes tamanhos de cadeia carbônica.

Para a avaliação de substratos sintéticos foi utilizado o método colorimétrico (item 2.7.1, capítulo I) com diferentes compostos derivados de *p*-nitrofenila, a saber: *p*NPP (Palmitato, C16:0), *p*NPL (Laurato, C12:0), *p*NPC (Caprilato, C8:0), *p*NPB (Butirato, C4:0) e *p*NPA (Acetato, C2:0). Como forma de padronização do ensaio, todos os substratos foram preparados com concentração de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ em isopropanol.

Para a avaliação de substratos naturais foi utilizado o método titulométrico (item 2.7.2, capítulo I) com diferentes óleos emulsificados, a saber: tributirina (C4:0), tricaprilina (C8:0), trioleína (C18:1 Δ^9) e óleo de oliva.

2.10 Efeito de surfactantes e solventes orgânicos

O extrato enzimático bruto obtido teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes surfactantes (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100, PEG-6000 e CHAPS) e solventes (acetona, acetonitrila, clorofórmio, éter dietílico, *n*-heptano, *n*-hexano, piridina, tolueno, metanol, etanol, 2-propanol e *t*-butanol) comumente utilizados na indústria. Para cada surfactante, 900 μL de extrato bruto previamente diluído foi incubado por 5 min com 100 μL de solução estoque do surfactante a 10% (m/v), atingindo uma concentração final igual a 1% (m/v). Para os solventes testados, a concentração final testada foi de 10%. Um controle foi realizado utilizando-se extrato bruto diluído na mesma proporção com água destilada no lugar das soluções. Para a realização dos ensaios enzimáticos, 100 μL dos extratos com aditivos foram incubados com 900 μL da solução de substrato do ensaio colorimétrico conforme descrito no item 2.6.1.

2.11 Efeito de íons

O extrato enzimático bruto obtido teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes íons. Os íons avaliados foram derivados dos seguintes sais preparados em água a 200 mmol.L^{-1} : AgNO_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , FeSO_4 , KCl , KF , KI , KNO_3 , LiCl , MgCl_2 , MgSO_4 , MnCl_2 , MnSO_4 , NaCl , NaNO_3 , NH_4Cl , NiSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e ZnSO_4 . Avaliou-se também a influência do agente quelante EDTA 200 mmol.L^{-1} . Para cada composto, $950 \mu\text{L}$ de extrato bruto previamente diluído foi incubado por 5 min com $50 \mu\text{L}$ de solução estoque do composto a 200 mmol.L^{-1} , atingindo uma concentração final igual a 10 mmol.L^{-1} . Como controle do experimento, o mesmo foi feito incubando-se com água destilada. Em seguida, estes foram utilizados na determinação da atividade lipolítica por meio do método colorimétrico conforme descrito no item 2.6.1.

2.12 Análises Estatísticas

2.12.1 Teste de Tukey

A análise estatística foi empregada para verificar diferenças significativas entre amostras independentes após etapa de quantificação da atividade lipolítica. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (Tukey, 1953).

2.12.2 Teste de Comparação de Médias

Para avaliar o efeito de íons, surfactantes e solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica dos extratos enzimáticos brutos obtidos, empregou-se o teste de hipótese para igualdade de médias com variâncias estatisticamente iguais ou com variâncias estatisticamente diferentes. Para comparação foi tido como referência sempre o resultado obtido para o controle (incubação com água destilada). A análise foi realizada considerando amostras independentes e um nível de significância de 5%.

2.13 SDS-PAGE

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), as amostras de interesse foram inicialmente submetidas à precipitação com

ácido tricloroacético (TCA). Para isso, foram adicionados 225 μL de TCA 100% a 900 μL de amostra e incubados a 4 °C *overnight*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 $\times g$ por 15 min e os *pellets* obtidos foram lavados com 500 μL de acetona 100% gelada seguida de centrifugação a 20.000 $\times g$ por 15 min por três ciclos. Ao final, o pellet seco foi ressuscitado em 20 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 72,5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 2% SDS m/v; 10% Sacarose m/v; DTT 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 0,01% Azul de bromofenol; pH 6,8) e submetidas a um tratamento de desnaturação a 100°C por 5 min. Por fim, as amostras foram aplicadas em géis com concentração de 12% de poliacrilamida preparados segundo o protocolo tradicional descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em sistema Bio-Rad Mini Protean II em tampão de corrida (Tris 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; Glicina 190 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; SDS 3,45 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) aplicando-se uma corrente constante de 100 V por gel. Para visualização das bandas, os géis foram corados com solução de Coomassie (*Coomassie Brilliant Blue G-250* 0,25% m/v; Metanol 30% v/v; Ácido acético 7% v/v).

Alternativamente, para a análise da atividade lipolítica *in gel*, as amostras foram tratadas conforme protocolo descrito por Diaz e colaboradores (1999) e Prim e colaboradores (2003). Para tal, foi feito um gel de poliacrilamida 12% conforme descrito no tópico 2.10.1. Após a corrida, o gel foi lavado em solução de Triton X-100 2,5% por 30 min para retirada do SDS. Em seguida, o gel foi lavado em tampão fosfato de sódio 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 e, então, incubado em solução de substrato 4-Metilumbeliferil-Butirato (MUF-butirato) 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em fotodocumentador (Bio-Rad Gel Doc™ EZ) sob luz UV até o aparecimento das bandas.

2.14 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi determinada incubando o extrato enzimático bruto a diferentes temperaturas (30-70 °C) durante 45,5 h. As atividades residuais foram medidas periodicamente pelo método titulométrico usando trioleína como substrato. A cinética de inativação de primeira ordem foi usada para determinar o kd e os tempos de meia-vida $t_{1/2}$.

3. Resultados e Discussão

3.1 Otimização do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 para produção de lipases

A fim de padronizar o cultivo e a produção das lipases pela bactéria *B. gladioli* BRM58833, propôs-se uma série de experimentos, sendo a obtenção de uma curva de crescimento o primeiro deles. Este experimento foi importante para determinar qual a faixa de absorvância em que a bactéria se encontra na fase exponencial (log) de crescimento para que, a partir desta informação, fosse padronizada qual OD (densidade ótica) seria utilizada para transferir as bactérias do pré-inóculo (cultivo submerso) para o cultivo de produção da lipase (cultivo por fermentação em estado sólido). Assim, a OD do cultivo submerso de *B. gladioli* BRM58833 foi acompanhada e apresentou o perfil observado na Figura III.1.

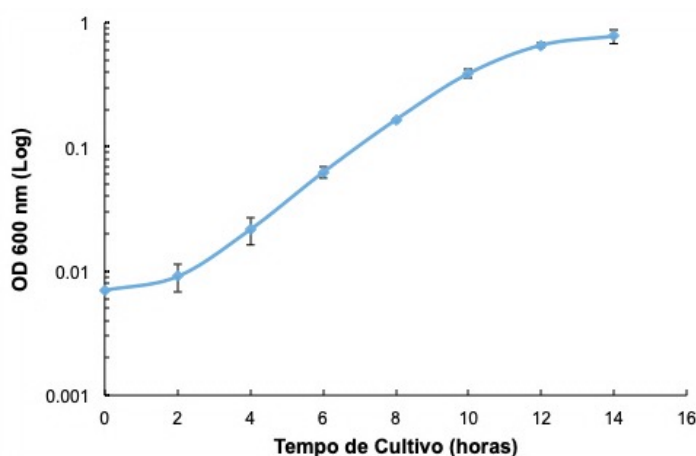


Figura III.1. Curva de crescimento da bactéria *B. gladioli* BRM58833 em meio LB. Condições de cultivo: temperatura 28 °C e agitação de 180 rpm.

Após avaliação da curva obtida, padronizou-se o cultivo do pré-inóculo até a OD de 0,5.

Para a otimização da produção de lipases pela bactéria *B. gladioli* BRM58833, realizaram-se cultivos preliminares para determinar que tipo de solução seria utilizada para umedecer o farelo de trigo nos cultivos por FES. Deste modo, foram comparadas as produções de lipase quando cultivada a

bactéria em farelo de trigo umedecido com meio de cultura sintético ou tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1} , sendo ambas as soluções tamponadas em pH 7,0. Concomitantemente, avaliou-se a utilização do óleo de soja como indutor de produção de lipases ao invés do óleo de oliva. Os resultados das atividades lipolíticas obtidas destes cultivos estão demonstrados na Figura III.2.

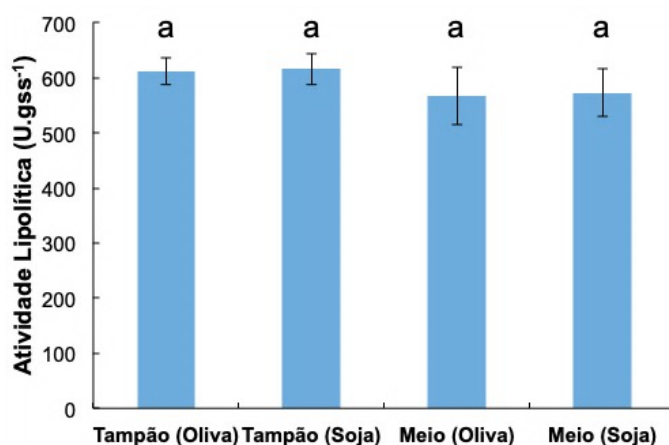


Figura III.2. Cultivos de *B. gladioli* BRM58833 por FES em farelo de trigo usando diferentes soluções umidificadoras e óleos indutores. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 30 °C, umidade 65%, óleo indutor 5% (m/m) e 1 mL de pré-inóculo com OD₆₀₀ 0,5. Método de análise: hidrólise do pNPP (colorimétrico).

Por meio da análise estatística (Tukey), observa-se que todos os grupos são iguais entre si quando comparados dois a dois. Deste modo, não importa se o substrato para o cultivo da bactéria foi umedecido com tampão ou com meio de cultura. Tampouco importou se o indutor utilizado foi o óleo de oliva ou o óleo de soja. Deste modo, visando facilitar o preparo e baratear a produção das lipases, já que o uso de um meio de cultura sintético exige uma variedade e quantidade de reagentes maior, optou-se pela condição de cultivo umedecida com tampão fosfato de sódio. Em relação ao óleo indutor, optou-se pela utilização de óleo de soja, já que este apresenta menor custo e maior abundância de produção nacional.

Determinados o óleo indutor (óleo de soja refinado) e a solução umidificadora (tampão fosfato de sódio 100 mmol.L^{-1}) a serem utilizados e

baseando-se nos trabalhos da literatura de FES com bactérias (disponível no Anexo I), definiram-se as variáveis de estudo para o DCCR: temperatura, pH, umidade, quantidade de óleo indutor e a OD do inóculo. Desta forma, construiu-se uma matriz de experimentos contendo três réplicas do ponto central. Após os cinco dias de cultivo, as atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos brutos foram medidas pelo método colorimétrico (Tabela III.1).

Tabela III.1. DCCR com variáveis reais e codificadas (entre parênteses) para otimização do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 por FES em farelo de trigo. Método de análise: hidrólise do pNPP.

#	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ pH	X ₃ Umidade (%)	X ₄ Óleo Indutor m/m (%)	X ₅ Inóculo (OD ₆₀₀)	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)
1	24,4 (-1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	93,7 ± 14,4
2	24,4 (-1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	3 (-1)	1,2 (1)	208,2 ± 14,4
3	24,4 (-1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	8 (1)	0,5 (-1)	3,9 ± 6,2
4	24,4 (-1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	8 (1)	1,2 (1)	153,2 ± 8,2
5	24,4 (-1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	3 (-1)	0,5 (-1)	424,1 ± 25,9
6	24,4 (-1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	3 (-1)	1,2 (1)	477,6 ± 15,5
7	24,4 (-1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	8 (1)	0,5 (-1)	99,9 ± 7,1
8	24,4 (-1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	8 (1)	1,2 (1)	120,1 ± 8,2
9	24,4 (-1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	116,9 ± 6,4
10	24,4 (-1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	3 (-1)	1,2 (1)	269,7 ± 13,7
11	24,4 (-1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	8 (1)	0,5 (-1)	122,9 ± 8,6
12	24,4 (-1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	8 (1)	1,2 (1)	259,8 ± 44,4
13	24,4 (-1)	7,5 (1)	59,5 (1)	3 (-1)	0,5 (-1)	348,4 ± 48,1
14	24,4 (-1)	7,5 (1)	59,5 (1)	3 (-1)	1,2 (1)	392,6 ± 28,5
15	24,4 (-1)	7,5 (1)	59,5 (1)	8 (1)	0,5 (-1)	126,7 ± 10,5
16	24,4 (-1)	7,5 (1)	59,5 (1)	8 (1)	1,2 (1)	213,3 ± 48,8
17	35,6 (1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	5,5 ± 7,0
18	35,6 (1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	3 (-1)	1,2 (1)	133,8 ± 10,9
19	35,6 (1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	8 (1)	0,5 (-1)	0,5 ± 0,3
20	35,6 (1)	5,5 (-1)	45,5 (-1)	8 (1)	1,2 (1)	93,6 ± 11,3
21	35,6 (1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	3 (-1)	0,5 (-1)	309,4 ± 3,2
22	35,6 (1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	3 (-1)	1,2 (1)	487,9 ± 17,7
23	35,6 (1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	8 (1)	0,5 (-1)	325,2 ± 42,2
24	35,6 (1)	5,5 (-1)	59,5 (1)	8 (1)	1,2 (1)	429,3 ± 50,0
25	35,6 (1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	3 (-1)	0,5 (-1)	23,9 ± 27,9

26	35,6 (1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	3 (-1)	1,2 (1)	150,2 ± 21,0
27	35,6 (1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	8 (1)	0,5 (-1)	23,8 ± 24,0
28	35,6 (1)	7,5 (1)	45,5 (-1)	8 (1)	1,2 (1)	129,5 ± 44,6
29	35,6 (1)	7,5 (1)	59,5 (1)	3 (-1)	0,5 (-1)	397,3 ± 31,1
30	35,6 (1)	7,5 (1)	59,5 (1)	3 (-1)	1,2 (1)	449,0 ± 31,4
31	35,6 (1)	7,5 (1)	59,5 (1)	8 (1)	0,5 (-1)	242,4 ± 7,8
32	35,6 (1)	7,5 (1)	59,5 (1)	8 (1)	1,2 (1)	192,9 ± 0,9
33	20 (-1,78)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	208,2 ± 0,6
34	40 (1,78)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	140,7 ± 53,2
35	30 (0)	4,7 (-1,78)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	210,6 ± 44,6
36	30 (0)	8,3 (1,78)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	234,0 ± 5,3
37	30 (0)	6,5 (0)	40 (-1,78)	5,5 (0)	0,85 (0)	8,5 ± 2,5
38	30 (0)	6,5 (0)	65 (1,78)	5,5 (0)	0,85 (0)	336,5 ± 33,7
39	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	1 (-1,78)	0,85 (0)	541,5 ± 34,5
40	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	10 (-1,78)	0,85 (0)	575,3 ± 46,2
41	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,2 (-1,78)	205,9 ± 12,9
42	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	1,5 (1,78)	243,4 ± 9,6
43	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	254,9 ± 49,1
44	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	213,2 ± 13,1
45	30 (0)	6,5 (0)	52,5 (0)	5,5 (0)	0,85 (0)	234,0 ± 29,5

A função $f(x)$ que descreve a resposta em atividade lipolítica dadas as condições de cultivo compreendidas na faixa analisada é apresentada na Equação 1 com variáveis codificadas e considerando parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,1$).

$$\begin{aligned}
 f(x) = & 299,2 + 100,9 \cdot X_3 + 70,2 \cdot X_4^2 - 49,0 \cdot X_3^2 - 48,8 \cdot X_4 - 44,8 \cdot X_1^2 \\
 & + 43,5 \cdot X_1 \cdot X_3 + 40,8 \cdot X_5 - 38,8 \cdot X_3 \cdot X_4 - 29,8 \cdot X_2^2 - 29,0 \cdot X_5^2 \\
 & + 25,5 \cdot X_1 \cdot X_4 - 20,0 \cdot X_2 \cdot X_3 - 18,1 \cdot X_3 \cdot X_5 - 15,5 \cdot X_1 \cdot X_2
 \end{aligned}$$

Equação (1)

A análise de variância (ANOVA) indicou que o F calculado (F_{calc}) para a regressão foi maior do que o F tabelado (F_{tab}), indicando que o modelo foi significativo e satisfaz os requisitos para a construção de superfícies de resposta. A relação de F ($F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$) para a regressão foi de 23,6 e o coeficiente de correlação (R^2) para o modelo foi de 89,8%. Assim, a ANOVA apontou que o modelo é adequado para fins preditivos, já que a relação de $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$ obtida foi superior a 3, conforme recomendado por Box (1978). A ANOVA indicou, ainda,

que o F_{calc} para a falta de ajuste foi menor do que o F_{tab} , fazendo com que modelo seja considerado adequado. Ademais, o critério para o modelo ser considerado bem ajustado (relação $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}} < 0,1$) foi satisfeito. Sendo assim, o modelo pode ser utilizado para predições.

A partir da função obtida, os autovalores e os ajustes do modelo para a forma canônica foram determinados para verificar a natureza do ponto estacionário. A obtenção de autovalores com valores positivos e negativos simultaneamente, indicou que o ponto de inflexão é em formato de sela e apresentou diferentes máximos locais na faixa analisada. Então, usando o modelo como função objetivo e a região experimental como condição de restrição, foi utilizado o algoritmo de solução numérica iterativa não-linear, selecionando regiões para as quais o valor de resposta retornado pela função e restrições fosse maior que 770 U.gss^{-1} . Assim, por ser a condição com maior valor calculado, optou-se pela validação do cultivo nas condições de temperatura de $32,6 \text{ }^\circ\text{C}$ ($X_1 = 0,46$), pH $5,8$ ($X_2 = -0,7$), umidade de 65% ($X_3 = 1,78$), quantidade indutor igual a $1\% \text{ m/m}$ ($X_4 = -1,78$) e OD do inóculo inicial de $0,9$ ($X_5 = 0,15$), com atividade lipolítica esperada de $778,6 \text{ U.gss}^{-1}$. Assim, foi realizado o cultivo de validação encontrando-se uma atividade lipolítica de $811,4 \pm 34,7 \text{ U.gss}^{-1}$. Este valor corresponde a um erro absoluto de $32,8 \text{ U.gss}^{-1}$ e um erro relativo de $4,2\%$. Devido à boa correlação entre os valores preditos, os resultados empíricos obtidos e as análises de variância dos modelos gerados, o modelo foi considerado válido para descrever o comportamento da produção de lipases pela bactéria *Burkholderia gladioli* BRM58833 quando cultivada em farelo de trigo por fermentação em estado sólido.

3.2 Otimização da extração de lipases dos SFL obtidos do cultivo de *B. gladioli* BRM58833

Considerando as condições de cultivo otimizadas explicitadas acima, a atividade lipolítica esperada foi de $778,6 \text{ U.gss}^{-1}$ quando utilizada a solução extratora contendo Triton X-100 e goma arábica. De acordo com a literatura em relação à produção de lipases por FES, existe uma grande variedade de métodos de cultivo e extração destas enzimas. Se por um lado alguns estudos necessitam incubar os sólidos fermentados obtidos do cultivo por FES apenas com água destilada (Veerabhadrapa *et al.*, 2014), uma solução salina

(Toscano *et al.*, 2013) ou mesmo um tampão (Sahoo *et al.*, 2014) para recuperar o extrato enzimático bruto em uma forma líquida que possa ser melhor avaliada, outros necessitam utilizar surfactantes para dessorver as lipases dos sólidos fermentados (Vaseghi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014). Deste modo, visando otimizar o processo de obtenção das lipases abordadas neste trabalho, avaliou-se o potencial de utilização de sete soluções extratoras diferentes: 1) água destilada (AD); 2) solução salina de cloreto de sódio 2% (SS); 3) tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TP); 4) solução de Tween-20 0,2% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (T20); 5) solução de Tween-80 0,2% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (T80); 6) solução de Triton X-100 0,4% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TX100); e 7) solução de Triton X-100 0,4% e goma arábica 0,1% em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0 (TXG). Após o cultivo de *B. gladioli* BRM58833 conforme condições otimizadas, procedeu-se com a etapa de obtenção dos extratos enzimáticos brutos com as diferentes soluções extratoras (Figura III.3).

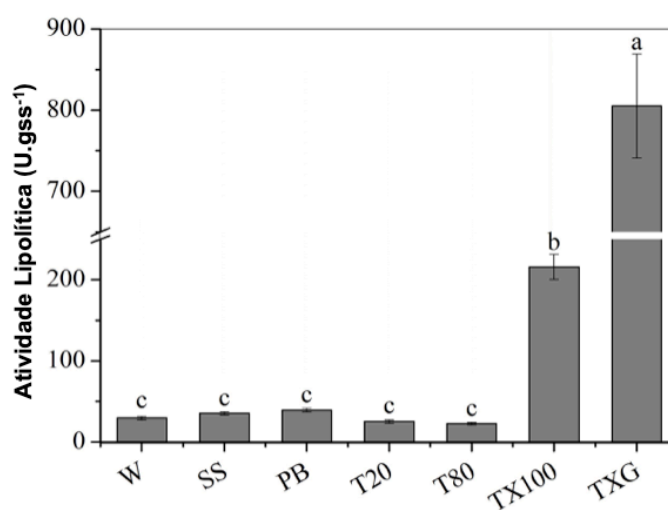


Figura III.3. Atividades lipolíticas dos extratos enzimáticos brutos de *B. gladioli* BRM58833 obtidos com diferentes soluções extratoras. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). W: água destilada; SS: solução salina de cloreto de sódio 2%; TP: tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,0; T20: solução de Tween-20 0,2% em TP; T80: solução de Tween-80 0,2% em TP; TX100: solução de Triton X-100 0,4% em TP; e TXG: solução de Triton X-100 0,4% e goma arábica 0,1% em TP. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, 32,6 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ de 0,9. Método de análise: hidrólise do pNPP.

Avaliando-se os resultados obtidos, é evidente a distinção de respostas de atividade lipolítica frente à utilização de diferentes soluções extratoras. Enquanto não houve diferença estatística observada entre as atividades lipolíticas para a extração com AD, SS, TP, T20 e T80, a utilização de TX100 resultou em uma atividade 5,5 vezes maior se comparada à condição equivalente sem o uso do Triton X-100 (TP). Já para o uso de TXG, esta diferença se torna ainda mais discrepante, que apresentou a maior atividade lipolítica, de $805,1 \pm 64,0 \text{ U.gss}^{-1}$, referente a um valor 3,7 vezes maior do que a condição obtida para TX100.

O resultado obtido destaca duas questões interessantes: o uso do Triton X-100 e da goma arábica como aditivos necessários à obtenção de uma atividade lipolítica elevada.

Apesar de hidrofílicas em sua superfície, as lipases são conhecidas por atuar justamente em uma interface hidrofílico-hidrofóbica devido às características hidrofóbicas dos substratos sobre os quais atuam. Para isso, estas apresentam bolsões hidrofóbicos que as permitem interagir com as moléculas de substrato e que, por vezes, podem ser responsáveis pela adsorção destas enzimas a superfícies hidrofóbicas. O Triton X-100 é um surfactante não iônico e, quando em soluções aquosas e em quantidade acima de sua concentração micelar crítica, forma micelas de aproximadamente 90 kDa. Este surfactante tem sido amplamente aplicado para a solubilização e estabilização de proteínas com porções hidrofóbicas em sua forma nativa, como proteínas de membrana. Neste mesmo sentido, o Triton X-100 demonstrou representar um papel fundamental na extração das lipases adsorvidas aos sólidos fermentados obtidos neste trabalho. Em contrapartida, o mesmo efeito para outros tipos de surfactantes, como Tween-20 e Tween-80, não foi observado (Figura III.3). Não obstante ao efeito observado para a extração e obtenção destas lipases, alguns trabalhos tem demonstrado a importância do Triton X-100 para a atividade lipolítica. O grupo de Redondo e colaboradores (1995) mostrou que as micelas formadas pelo surfactante em questão fornecem um ambiente adequado e facilmente reproduzível para o desempenho enzimático de diferentes lipases na hidrólise de ésteres. Em outros casos, este surfactante pode ter um efeito ativador ou inibidor sobre

diferentes lipases. Helistö e Korpela (1998) observaram que, enquanto para as lipases de *Penicillium* sp., *Candida cylindracea* e *Aspergillus carneus* o Triton X-100 apresentava um efeito inibitório, as lipases de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* e de *Bacillus* sp. foram ativadas pela presença do surfactante.

A goma arábica, por sua vez, é um composto derivado da seiva de várias espécies de acácias e é encontrada em diversos tipos de preparações, inclusive alimentícias, onde desempenha um papel de estabilizante e emulsificante. Como evidenciado pelo resultado apresentado na Figura III.3, o uso da goma arábica em conjunto com o Triton X-100 potencializou a atividade lipolítica encontrada em quase quatro vezes quando comparada à extração sem o uso deste composto. É possível que a goma arábica desempenhe, portanto, um papel de estabilização tanto do complexo lipase-surfactante durante o processo de extração bem como da emulsão do substrato-surfactante no momento de aferição da atividade lipolítica.

Em vista dos resultados obtidos, foram selecionadas as variáveis correspondentes aos constituintes da solução extratora TXG (força iônica e pH do tampão, quantidade de Triton X-100 e quantidade de goma arábica) para uma etapa de otimização da obtenção do extrato enzimático bruto. Avaliou-se também a temperatura do processo de extração. Este procedimento foi realizado por meio de um DCCR, conforme apresentado na Tabela III.2.

Tabela III.2. DCCR com variáveis reais e codificadas (entre parênteses) para otimização da extração de lipases do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 por FES. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 32,6 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ ajustada para 0,9. Método de análise: hidrólise do pNPP.

#	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ Força Iônica (mmol.L ⁻¹)	X ₃ pH	X ₄ Triton X-100 m/v (%)	X ₅ Goma Arábica m/v (%)	Atividade Lipolítica (U.gss ⁻¹)
1	11,6 (-1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	348,0 ± 19,0
2	11,6 (-1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	323,9 ± 10,2
3	11,6 (-1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	617,1 ± 23,7
4	11,6 (-1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,3 (1)	663,3 ± 50,7
5	11,6 (-1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	467,2 ± 24,9
6	11,6 (-1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	406,0 ± 12,2
7	11,6 (-1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	540,7 ± 22,2
8	11,6 (-1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,3 (1)	678,1 ± 49,1
9	11,6 (-1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	398,6 ± 21,7
10	11,6 (-1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	391,1 ± 11,5
11	11,6 (-1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	762,4 ± 31,9
12	11,6 (-1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,3 (1)	714,8 ± 42,1
13	11,6 (-1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	551,0 ± 16,2
14	11,6 (-1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	569,6 ± 5,6
15	11,6 (-1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	759,5 ± 90,7
16	11,6 (-1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,3 (1)	825,5 ± 19,6
17	28,4 (1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	288,9 ± 28,1
18	28,4 (1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	256,7 ± 18,4
19	28,4 (1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	498,6 ± 18,8
20	28,4 (1)	31,9 (-1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,3 (1)	466,7 ± 43,5
21	28,4 (1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	395,5 ± 11,4
22	28,4 (1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	383,0 ± 25,4
23	28,4 (1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	484,7 ± 70,0
24	28,4 (1)	31,9 (-1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,3 (1)	491,4 ± 13,2
25	28,4 (1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	211,2 ± 17,0
26	28,4 (1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	146,7 ± 4,8
27	28,4 (1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	550,3 ± 44,2
28	28,4 (1)	88,1 (1)	5,9 (-1)	0,8 (1)	0,3 (1)	550,0 ± 41,9
29	28,4 (1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,1 (-1)	488,0 ± 46,7
30	28,4 (1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,2 (-1)	0,3 (1)	561,8 ± 32,2
31	28,4 (1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,1 (-1)	316,7 ± 22,5
32	28,4 (1)	88,1 (1)	8,1 (1)	0,8 (1)	0,3 (1)	348,1 ± 13,3
33	5 (-1,78)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	517,9 ± 12,6

34	35 (1,78)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	561,9 ± 24,0
35	20 (0)	10 (-1,78)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	545,3 ± 34,1
36	20 (0)	110 (1,78)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	668,0 ± 42,2
37	20 (0)	60 (0)	5 (-1,78)	0,5 (0)	0,2 (0)	758,7 ± 68,3
38	20 (0)	60 (0)	9 (1,78)	0,5 (0)	0,2 (0)	837,6 ± 45,9
39	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0 (-1,78)	0,2 (0)	36,6 ± 2,1
40	20 (0)	60 (0)	7 (0)	1 (1,78)	0,2 (0)	867,5 ± 55,5
41	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,02 (-1,78)	792,5 ± 37,1
42	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,38 (1,78)	832,4 ± 69,9
43	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	934,5
44	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	794,9
45	20 (0)	60 (0)	7 (0)	0,5 (0)	0,2 (0)	755,3

A função $f(y)$ que descreve a resposta em atividade lipolítica dadas as condições de extração compreendidas na faixa analisada é apresentada na Equação 2 com variáveis codificadas e considerando parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,1$).

$$f(y) = 812,1 - 131,2 \cdot X_4^2 + 118,9 \cdot X_4 - 103,7 \cdot X_1^2 - 82,7 \cdot X_2^2 - 65,2 \cdot X_1 - 57,4 \cdot X_3 \cdot X_4 - 35,3 \cdot X_1 \cdot X_4 - 31,9 \cdot X_1 \cdot X_2 + 31,8 \cdot X_3 + 27,5 \cdot X_2$$

Equação (2)

A análise de variância (ANOVA) indicou que o F calculado (F_{calc}) para a regressão foi maior do que o F tabelado (F_{tab}), indicando que o modelo foi significativo e satisfaz os requisitos para a construção de superfícies de resposta. A relação de F ($F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$) para a regressão foi de 8,4 e o coeficiente de correlação (R^2) para o modelo foi de 84,1%. Assim, a ANOVA apontou que o modelo é adequado para fins preditivos, já que a relação de $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$ obtida foi superior a 3, conforme recomendado por Box (1978). A ANOVA indicou, ainda, que o F_{calc} para a falta de ajuste foi menor do que o F_{tab} , fazendo com que modelo seja considerado adequado. Ademais, o critério para o modelo ser considerado bem ajustado (relação $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}} < 0,1$) foi satisfeito. Sendo assim, o modelo pode ser utilizado para predições.

A função que codifica o modelo em questão foi utilizada para determinar os pontos de máxima recuperação da atividade lipolítica por meio da etapa de

extração, sendo correspondente às condições de temperatura 16,2 °C ($X_1 = -0,447$), força iônica do tampão em 67,1 mmol.L⁻¹ ($X_2 = 0,252$), pH do tampão de 6,8 ($X_3 = -0,186$), Triton X-100 0,7% ($X_4 = 0,554$) e goma arábica 0,1% ($X_5 = -1,00$). Neste ponto a atividade predita foi de 859,8 U.gss⁻¹. Após extração em tais condições para validação experimental do modelo, obteve-se uma atividade de 837,7 ± 12,7 U.gss⁻¹. Este valor corresponde a um erro absoluto de -22,1 U.gss⁻¹ e um erro relativo de 2,6%. Devido à boa correlação entre os valores preditos, os resultados empíricos obtidos e as análises de variância dos modelos gerados, o modelo foi considerado válido para descrever o comportamento da extração de lipases dos sólidos fermentados obtidos do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 em farelo de trigo por FES.

3.3 Cinética de produção de lipases

Considerando as condições otimizadas de cultivo e de extração das lipases, avaliou-se a produção de lipases ao longo de diferentes dias de cultivo para determinar o tempo ideal de produção destas enzimas. Foram analisadas amostras de cultivos independentes a cada 24 h, sempre em triplicata. A curva de produção de lipases é apresentada na Figura III.4.

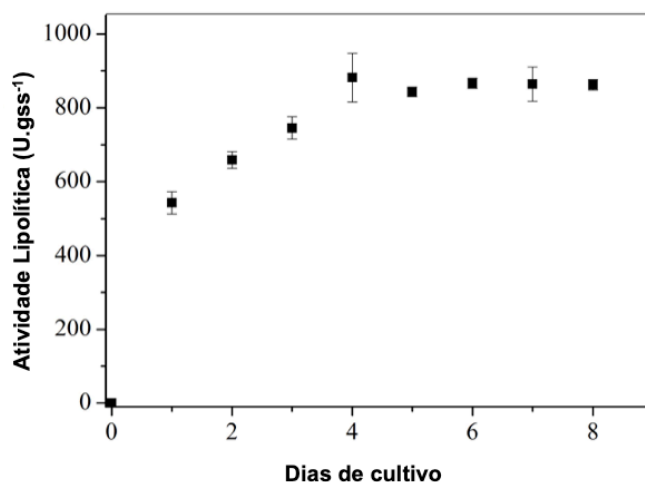


Figura III.4. Produção de lipases para diferentes dias de cultivo em condições otimizadas de cultivo e extração. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, temperatura 32,6 °C, umidade 65%, umedecido com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ ajustada para 0,9. Condições de extração: temperatura 16,2 °C, tampão fosfato de sódio 67,1 mmol.L⁻¹ pH 6,8, Triton X-100 0,7% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v). Método de análise: hidrólise do pNPP.

Com a análise das atividades lipolíticas, pode ser observado que há uma intensa produção de lipases nos primeiros dias de cultivo sendo que ao quarto dia é atingido um nível de expressão que se mantém estável ao longo do restante dos dias avaliados. Anteriormente, o cultivo vinha sendo realizado por cinco dias para todos os experimentos de otimização de produção da lipase. Contudo, a partir dos resultados obtidos por esta cinética de produção, a resposta obtida, em atividade lipolítica, é estatisticamente a mesma alcançada com um dia de cultivo a menos. O cultivo da bactéria por quatro dias reflete em uma menor utilização de recursos e tempo para obtenção da enzima, contribuindo para a redução de custos associados à produção desta enzima e aos produtos finais que poderão ser obtidos por meio dela.

Ao final do processo de otimização da produção e extração das lipases obteve-se um extrato enzimático bruto com atividade lipolítica de $900,1 \pm 66,0$ U.gss⁻¹ se avaliada após quatro dias de cultivo por FES. Este valor corresponde a um aumento de 47,2% na atividade lipolítica se comparado ao valor obtido anteriormente para a condição de cultivo umedecida com tampão e induzida com óleo de oliva, referente a $611,6 \pm 24,0$ U.gss⁻¹. O aumento expressivo de atividade lipolítica observado reflete o potencial das metodologias de otimização de processos utilizadas.

Se comparada aos valores publicados na literatura para bactérias cultivadas por FES, a atividade lipolítica encontrada após o cultivo de *B. gladioli* BRM58833 foi bastante expressiva, sendo inferior apenas à obtida para o cultivo de *Bacillus pumilus*, que atingiu 1974 U.gss⁻¹ (Sangeetha *et al.*, 2011). Entretanto, comparada ao valor de atividade lipolítica para muitos fungos filamentosos, a atividade lipolítica encontrada neste trabalho ainda foi inferior (Tabela III.3). Ademais, é importante ressaltar que a ampla diversidade de métodos usados para detecção da atividade enzimática de lipases (como a hidrólise de ésteres de *p*-nitrofenila e o método titulométrico pH-stat) impede uma comparação direta e justa dos resultados e especificidades dos substratos.

Tabela III.3. Atividades lipolíticas encontradas na literatura referentes ao cultivo de microrganismos por fermentação em estado sólido.

Microrganismo	Atividade Lipolítica	Temperatura	pH	Substrato	Tipo de amostra	Referência
<i>Gliocladium roseum</i>	1370 U.gss ⁻¹	45 °C	8,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Nagy <i>et al.</i> , 2006)
<i>Bacillus coagulans</i>	161,89 U.gss ⁻¹	37 °C	7,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Alkan <i>et al.</i> , 2007)
<i>Burkholderia cepacia</i>	120 U.gss ⁻¹	37 °C	7,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Fernandes <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	625 U.gss ⁻¹	37 °C	8,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Mahanta <i>et al.</i> , 2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	234 U.gss ⁻¹	37 °C	7,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Salum <i>et al.</i> , 2010)
<i>Ganoderma lucidum</i>	4838 U.gss ⁻¹	37 °C	8,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Amin <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus pumilus</i>	1974 U.gss ⁻¹	60 °C	11,0	pNPP (C16:0)	Enzima parcialmente purificada (FES)	(Sangeetha <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacillus altitudinis</i>	7,65 U.gss ⁻¹	25 °C	7,2	pNPA (C2:0)	Extrato bruto (FES)	(Esakkiraj <i>et al.</i> , 2012)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	72 U.gss ⁻¹	40 °C	n.i.	Óleo Oliva (Titulação)	Sólidos fermentados (FES)	(Liu <i>et al.</i> , 2013)
<i>Aspergillus terreus</i>	2575 U.mL ⁻¹	37 °C	7,0	Óleo Oliva (Titulação)	Extrato bruto (FES)	(Sethi <i>et al.</i> , 2013)
<i>Burkholderia cepacia</i>	91,6 U.gss ⁻¹	40 °C	n.i.	Óleo Oliva (Titulação)	Sólidos fermentados (FES)	(Soares <i>et al.</i> , 2013)
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	72,3 U.gss ⁻¹	37 °C	7,0	Óleo Oliva (Titulação)	Sólidos fermentados (FES)	(Liu <i>et al.</i> , 2014)
<i>Rhizomucor miehei</i>	4415 U.gss ⁻¹	37 °C	6,8	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Kotogán <i>et al.</i> , 2014)
<i>Mucor corticolus</i>	1733,4 U.gss ⁻¹	25 °C	6,8	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Kotogán <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pseudomonas sp.</i>	57,9 U.gss ⁻¹	50 °C	7,0	pNPL (C12:0)	Extrato bruto (FES)	(Sahoo <i>et al.</i> , 2014)
<i>Aspergillus versicolor</i>	1288 U.gss ⁻¹	37 °C	8,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	(Veerabhadrapa <i>et al.</i> , 2014)
<i>Burkholderia gladioli</i>	900,1 U.gss ⁻¹	37 °C	7,0	pNPP (C16:0)	Extrato bruto (FES)	Este trabalho
<i>Burkholderia gladioli</i>	374, 2 U.gss ⁻¹	50 °C	9,0	Trioleína (Titulação)	Extrato bruto (FES)	Este trabalho

n.i.: não informado

3.4 Análise do secretoma de *B. gladioli* BRM58833

Segundo Gagic e colaboradores (2016), os secretomas de bactérias (proteínas periplasmáticas, membranares ou extracelulares) correspondem a 10-30% da capacidade de codificação de seus genomas. No entanto, deve-se estar ciente de que a quantidade e a diversidade das proteínas secretadas irão flutuar dependendo das condições e estímulos ambientais.

A análise proteômica experimental do extrato enzimático bruto otimizado retornou 698 identificações. Destas, 163 apresentavam um peptídeo sinal predito e o restante correspondia a proteínas intracelulares, que podem ter sido liberadas por lise celular durante a FES ou mesmo durante a etapa de extração, devido ao uso do Triton X-100. Como o objetivo deste trabalho era encontrar e caracterizar lipases, proteínas ligadas à membrana e periplasmáticas foram descartadas para a análise final, que consistia no subconjunto de 64 proteínas extracelulares. As sequências hipotéticas de proteínas foram comparadas com o banco de dados do NCBI usando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para inferir seu papel biológico. Enquanto aqueles sem semelhança com proteínas conhecidas permaneceram como proteínas hipotéticas, aqueles inferidos pelo BLAST foram posteriormente anotados e categorizados de acordo com sua classe. Uma porção representativa do secretoma (33 proteínas; 51,6%) era composta por enzimas, posteriormente categorizadas como peptidases (9 proteínas; 14,1%), amidases (1 proteína; 1,6%), esterases/lipases (5 proteínas; 7,8%), outras carboxilesterases (2 proteínas; 3,1%), glicosidases (9 proteínas; 14,1%), oxidoredutases (3 proteínas; 4,7%), isomerases (3 proteínas; 4,7%) e liases (1 proteína; 1,6%). As proteínas hipotéticas foram 27 (42,2%), das quais 10 tinham domínios conservados de função desconhecida. Outras proteínas sem atividade catalítica foram 4, representando 6,3% do secretoma (Anexo III).

A análise proteômica revelou que a atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM58833 em condições otimizadas é uma ação combinada de duas esterases e três lipases (Tabela III.4). No entanto, quando avaliados em gel, apenas três bandas distintas de atividade lipolítica são visualizadas (Figura III.5). A banda com a

maior intensidade no zimograma parece corresponder à lipase WP_165652138.1, não apenas por seu tamanho de 36 kDa, mas também por suas características que se encaixam na descrição de lipases verdadeiras agrupadas com outras lipases de *Burkholderia* dentro da subfamília I.2 de enzimas lipolíticas, como a presença de um gene foldase específico da lipase a jusante da via do gene da lipase (Rosenau et al., 2004). Embora se acredite que esta lipase possa ser a maior contribuinte para a atividade lipolítica encontrada no extrato bruto enzimático, é interessante notar que a ação sinérgica combinada dessas esterases e lipases em um único extrato enzimático pode ampliar sua atividade e aplicações, possibilitando-o a exibir diferentes especificidades de substrato e levando a um aumento na taxa de reação (Aguieira et al., 2015). Por exemplo, no contexto da produção de biodiesel, o uso de tais extratos ricos representa uma vantagem, uma vez que substratos brutos, como óleos vegetais naturais e gorduras animais, apresentam uma composição heterogênea de diferentes comprimentos de cadeia de ácidos graxos, graus de saturação e posicionamento em relação ao glicerol. De fato, um estudo com lipases de *Thermomyces lanuginosus* aplicadas à síntese de biodiesel relatou um maior rendimento do teor de ésteres metílicos de ácidos graxos com o uso de um extrato bruto (enzima não purificada) do que com o uso da versão purificada (Tisma et al., 2019). Mais importante ainda, quando possível, o uso de enzimas não purificadas pode representar uma economia significativa no processo de biocatálise. Portanto, a fim de aplicar as enzimas em sua forma não purificada, as propriedades catalíticas do extrato bruto foram caracterizadas.

Tabela III.4. Proteínas com atividade lipolítica presentes no secretoma de *B. gladioli* BRM58833.

Código de Acesso (NCBI)	Enzima	E.C.	Tamanho (kDa)
WP_165652138.1	Lipase	3.1.1.3	36.8
WP_017919347.1	Carboxilesterase NIhH	3.1.1.1	37.2
WP_165651549.1	Esterase EstA	3.1.1.1	38.3
WP_017919529.1	Proteína Hipotética (SGNH/GDSL hidrolase)	3.1.1.3	45.4
WP_165651964.1	Lipase	3.1.1.3	45.8

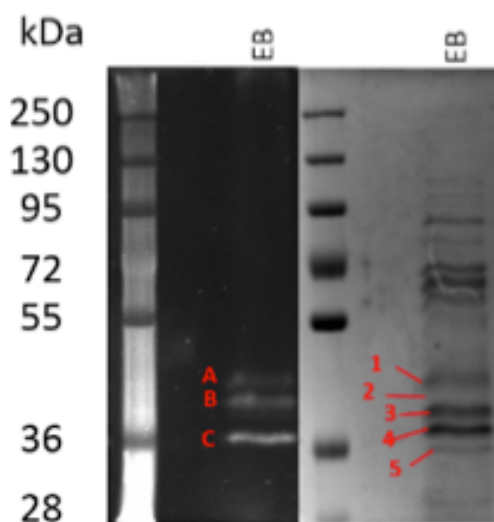


Figura III.5. Atividade lipolítica *in gel* do extrato enzimático bruto. O gel apresentado à esquerda é referente ao zimograma com MUF-Butirato e as letras A, B e C indicam as bandas correspondentes à atividade lipolítica. O gel apresentado à direita é correspondente ao mesmo gel da esquerda, mas corado com Coomassie. As indicações de 1 a 5 representam as bandas excisadas e enviadas para análise proteômica.

3.5 Caracterização do extrato enzimático bruto obtido

Após otimização de toda a etapa de cultivo da bactéria *B. gladioli* BRM58833 por FES e da extração das lipases produzidas, avaliaram-se as melhores condições de ensaio que resultassem em uma maior atividade lipolítica. Inicialmente foi analisada a preferência do extrato enzimático bruto

obtido por substratos de diferentes origens e tamanhos de cadeia carbônica (Figura III.6).

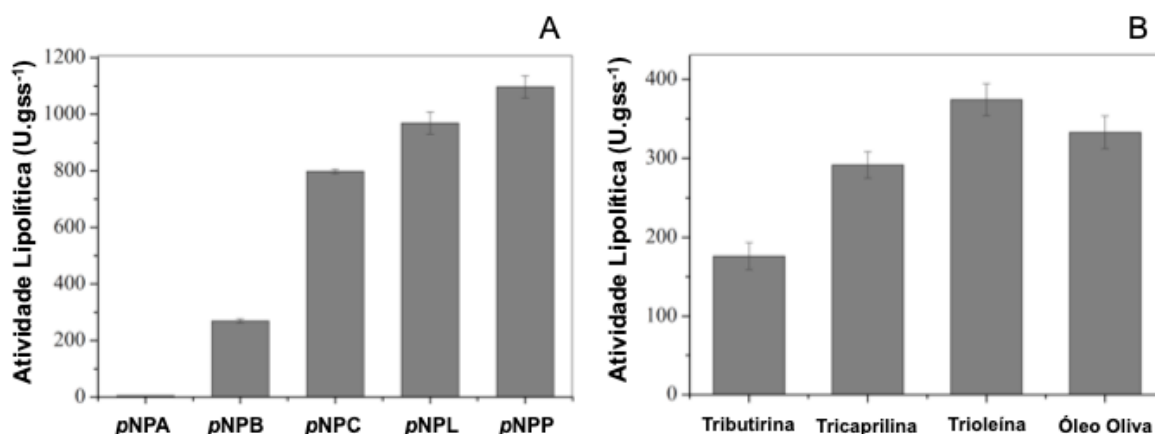


Figura III.6. Atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 frente a substratos sintéticos (A) e naturais (B). Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, 32,6 °C, 65% de umidade (tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8), óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ de 0,9. Condições de extração: 16,2 °C, tampão fosfato de sódio 67,1 mmol.L⁻¹ pH 6,8, Triton X-100 0,7% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v) com agitação de 150 rpm por 1 h. Para os substratos sintéticos foi utilizado o método colorimétrico de determinação da atividade lipolítica. Para os substratos naturais foi utilizado o método titulométrico de determinação da atividade lipolítica. pNPA: acetato de *p*-nitrofenila (C2:0); pNPB: butirato de *p*-nitrofenila (C4:0); pNPC: caprilato de *p*-nitrofenila (C8:0); pNPL: laurato de *p*-nitrofenila (C12:0); e pNPP: palmitato de *p*-nitrofenila (C16:0).

Os resultados obtidos contra substratos de cadeia longa corroboram as identificações do secretoma, evidenciando a ação das verdadeiras lipases presentes no extrato otimizado. Não obstante, os resultados obtidos demonstram que tanto para substratos sintéticos quanto para substratos naturais houve uma preferência por cadeias carbônicas longas. Para os substratos naturais, é interessante observar que a atividade lipolítica frente ao óleo de oliva foi menor que a apresentada frente à trioleína. Isso porque, apesar de o óleo de oliva ser composto em grande parte por trioleína, trata-se de uma mistura de triacilgliceróis de diferentes tamanhos de cadeia, fazendo com que a atividade lipolítica observada tenha um valor intermediário.

As maiores atividades lipolíticas obtidas foram de 1096,7 ± 39,3 U.gss⁻¹ para o pNPP e 374,2 ± 20,4 U.gss⁻¹ para a trioleína. Assim, estes substratos foram selecionados para dar continuidade aos experimentos de caracterização do extrato enzimático bruto obtido.

Sabe-se que o *p*NP responde diferentemente em absorvância de acordo com o pH do meio onde se encontra. Isso porque o composto que apresenta a cor amarela (lida no espectrofotômetro a 410 nm) é na verdade a forma ionizada do *p*NP. Como este composto apresenta um *pKa* próximo de 7,0, em valores de pH ácidos haverá muito menos *p*NP ionizado fazendo com que uma grande quantidade de *p*NP tenha uma resposta baixa de absorvância. Já para valores de pH alcalinos, grande parte do *p*NP se encontrará na forma ionizada, fazendo com que uma pequena quantidade de *p*NP seja percebida com uma resposta muito elevada de absorvância. Já para utilização em uma faixa de pH neutra (próxima de 7,0), como a utilizada até o momento por este trabalho, o método colorimétrico com uso de derivados de *p*NP se torna adequado. De todo modo, julgou-se mais apropriado a utilização do método titulométrico com trioleína para a determinação das melhores condições de pH e temperatura de ensaio.

Para a determinação do melhor pH de atuação das lipases obtidas, fixou-se a temperatura em 37 °C e foram avaliados os valores de pH em 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 (Figura III.7a).

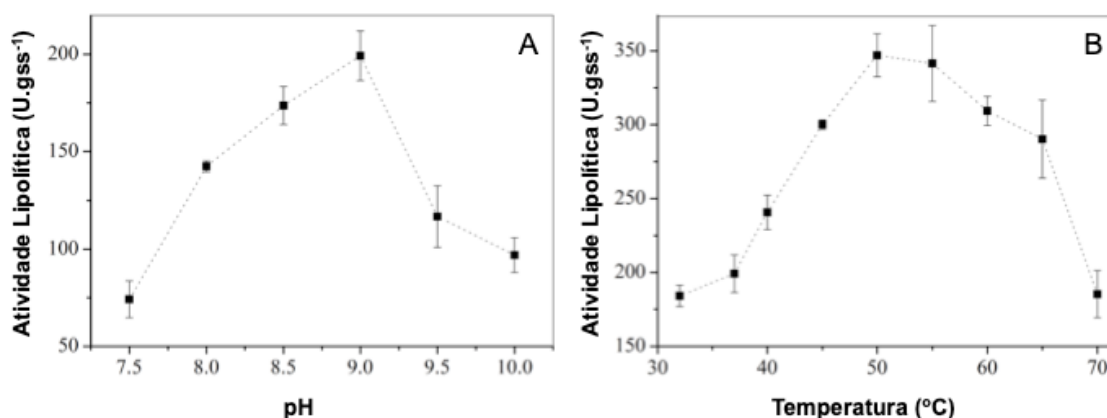


Figura III.7. Efeitos do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 em trioleína. Para a avaliação da condição de melhor pH, fixou-se a temperatura em 37 °C. Para a avaliação da condição de temperatura ótima, fixou-se o pH em 9,0. Condições de cultivo: substrato farelo de trigo, 32,6 °C, 65% de umidade (tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8), óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ de 0,9. Condições de extração: 16,2 °C, tampão fosfato de sódio 67,1 mmol.L⁻¹ pH 6,8, Triton X-100 0,7% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v). Método de análise: hidrólise da trioleína (titulométrico).

Por meio dos ensaios de determinação do efeito do pH na atividade enzimática, observou-se que o extrato enzimático bruto tem preferência por atuação em uma faixa de pH alcalina, mantendo até 50% de sua atividade máxima entre os valores de pH 8,0 e 10,0. O pico de atividade lipolítica foi observado com pH 9,0. As mudanças de pH podem influenciar na distribuição de cargas tanto da superfície da enzima quanto nas regiões de ligação ao substrato e catálise, promovendo um rearranjo da conformação tridimensional responsável pelas alterações na atividade catalítica da enzima (Di Russo et al., 2012). A redistribuição de cargas conforme mudanças de pH também pode ter interferido com o mecanismo de catapulta eletrostática das lipases (Petersen et al., 2001), resultando em perdas catalíticas.

Segundo Rigo e colaboradores (2012), a maioria das lipases microbianas são ativas em uma faixa de pH entre 7,0 e 9,0. Assim como para as lipases produzidas neste trabalho, outros autores encontraram lipases com maior atividade lipolítica em uma faixa alcalina. Enquanto as lipases de *Aspergillus fumigatus* (Rajan et al., 2011) e *Ganoderma lucidum* (Bhatti et al., 2013) apresentaram um pH ótimo de atuação em 8,5, as lipases produzidas por *Bacillus pumilus* (Sangeetha et al., 2011) apresentaram melhor performance em pH 11,0. Para as lipases de *Burkholderia cepacia* produzidas por Dalal e colaboradores (2008), a maior atividade também foi obtida com pH 9,0. Uma das aplicações mais comuns para lipases com atividade elevada em valores de pH alcalinos é como aditivo em formulações de detergentes para auxiliar a remoção de manchas de gorduras por meio da hidrólise deste material.

Valores de pH ácidos não foram avaliados devido às limitações de condição do ensaio, já que, para a titulação de ácidos graxos no modo pH-Stat, a faixa de pH de funcionamento do método deve ser igual ou superior ao pK_a aparente dos ácidos graxos em condições de ensaio para que estes estejam em sua forma ionizada e possam influenciar na leitura do pH e sua consequente titulação pelo hidróxido de sódio. Segundo Beisson e colaboradores (2000), para auxiliar a contornar o problema e reduzir o pK_a aparente dos ácidos graxos, é feita a adição de íons Ca^{2+} ao meio reacional. Estes íons são responsáveis pela formação de complexos com os ácidos graxos livres liberados da reação de hidrólise e promoção da microprecipitação

dos respectivos sais de ácido graxo, deslocando o equilíbrio da reação para a hidrólise e facilitando o processo de titulação. Sendo o pK_a aparente do ácido oleico (produto da reação de hidrólise da trioleína) em condições de ensaio próximo a 7,5, determinou-se este valor como limitante inferior da faixa de pH avaliada. A partir do perfil de hidrólise da trioleína apresentado na Figura III.6a, acredita-se que a atividade da enzima em uma faixa de pH ácida seria inferior à observada.

Seguindo o mesmo procedimento para determinação da melhor temperatura de atuação das lipases obtidas, fixou-se o pH em 9,0 e foram avaliadas as temperaturas de 32; 37; 40; 45; 50; 55; 60; 65 e 70 °C (Figura III.7b). A temperatura ótima para atuação das lipases foi obtida com 50 °C, sendo que a enzima manteve até 50% de sua atividade máxima por toda a faixa de temperatura avaliada. Em geral, a faixa mais utilizada para detecção de atividade lipolítica de enzimas microbianas tem sido 37 °C. Entretanto, assim como neste trabalho, outros autores tem relatado lipases com temperatura ótima de atuação mais elevadas. Dayanandan e colaboradores (2013) encontraram uma enzima de *Aspergillus tamaris* com atividade lipolítica ótima em 50 °C. Já as lipases de *Bacillus pumilus* obtiveram melhor performance em temperatura de 60 °C (Sangeetha *et al.*, 2011).

As lipases são enzimas extremamente versáteis e, portanto, de uma vasta aplicabilidade industrial. Muitas das reações de síntese são conduzidas em meios com a adição de solventes orgânicos ou outros aditivos que possam intensificar e potencializar a atuação destas enzimas. Assim, o uso de lipases na síntese orgânica tem se tornado cada vez mais atrativo. Deste modo, avaliou-se o efeito de aditivos ao meio reacional a fim de encontrar possíveis ativadores ou inibidores da atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido. A Tabela III.5 apresenta o efeito de solventes orgânicos, surfactantes e de íons sobre a atividade lipolítica.

Tabela III.5. Efeito de aditivos na atividade lipolítica do extrato enzimático bruto obtido do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM58833. Os aditivos marcados com asteriscos tiveram atividades estatisticamente diferentes do controle (teste t, nível de significância 5%). Tempo de incubação: 5 min. Método de análise: colorimétrico - hidrólise de pNPP a 37 °C e pH 7,0.

Aditivo		Atividade Relativa (%)	Aditivo		Atividade Relativa (%)
Controle		100,0 ± 2,9			
Compostos (10 mmol·L⁻¹)			Solventes (10% v/v)		
*	AgNO ₃	81,0 ± 2,2	*	Acetona	95,3 ± 1,7
*	Al ₂ (SO ₄) ₃	79,4 ± 1,5		Acetonitrila	98,1 ± 2,6
*	BaCl ₂	103,9 ± 2,0	*	Clorofórmio	85,8 ± 3,4
	CaCl ₂	100,7 ± 1,8		Dietil Éter	99,6 ± 2,8
*	CoCl ₂	96,4 ± 2,3	*	<i>n</i> -Heptano	104,8 ± 2,2
	CuSO ₄	94,2 ± 10,1		<i>n</i> -Hexano	101,3 ± 2,5
*	FeCl ₃	63,0 ± 2,4	*	Piridina	105,2 ± 2,8
*	FeSO ₄	112,3 ± 3,5		Tolueno	101,4 ± 1,5
*	KCl	95,7 ± 3,5		Metanol	96,8 ± 2,3
	KF	97,9 ± 2,0	*	Etanol	97,1 ± 0,4
*	KI	93,2 ± 1,5	*	2-Propanol	90,3 ± 3,1
	KNO ₃	103,0 ± 4,4		<i>t</i> -Butanol	100,5 ± 3,9
*	LiCl	96,9 ± 1,0	Surfactantes (1% m/v)		
*	MgCl ₂	109,8 ± 1,8		CHAPS	100,1 ± 5,4
	MgSO ₄	98,0 ± 1,9		Goma Arábica	98,0 ± 2,1
	MnCl ₂	100,4 ± 5,7		PEG-6000	101,0 ± 4,5
*	MnSO ₄	96,2 ± 2,1		Triton X-100	96,5 ± 3,8
	NaCl	98,6 ± 2,1	*	Tween 20	94,6 ± 1,8
	NaNO ₃	98,1 ± 1,9	*	Tween 80	92,4 ± 3,5
*	NH ₄ Cl	96,5 ± 1,1	*	SDS	3,8 ± 0,5
*	NiSO ₄	81,3 ± 0,9			
*	Pb(NO ₃) ₂	77,1 ± 10,3			
*	ZnSO ₄	51,5 ± 3,5			
*	EDTA	8,1 ± 2,0			

É possível observar que alguns íons apresentaram um efeito inibidor sobre as lipases do extrato enzimático estudado (Tabela III.5). Dentre os inibidores, destacam-se o EDTA, o sulfato de zinco ($ZnSO_4$) e o cloreto de ferro III ($FeCl_3$), que promoveram uma perda de atividade relativa de 91,9%, 48,5% e 37%, respectivamente. O EDTA é um conhecido agente quelante capaz de se ligar a diversos íons metálicos, impedindo a interação destes com as enzimas presentes no extrato bruto. Assim, é possível que a perda de atividade lipolítica ocasionada pela adição deste composto esteja relacionada à retirada de íons importantes à estrutura e funcionamento adequado das lipases estudadas.

Com relação a ativadores, o sulfato de ferro II ($FeSO_4$), o cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e o cloreto de bário ($BaCl_2$) foram os que proporcionaram um maior efeito positivo, apresentando uma atividade relativa de 112,3%, 109,8% e 103,9%, respectivamente. Apesar de não ter sido observado o mesmo efeito para todos os cátions bivalentes avaliados, é interessante notar que todos os ativadores encontrados se enquadram nessa categoria. Ainda nesta categoria, porém diferente do esperado, a adição do íon Ca^{2+} não promoveu um efeito positivo sobre a atividade lipolítica do extrato, como reportado para outras lipases na literatura. Se realmente necessário, é possível que a quantidade necessária ao bom funcionamento das enzimas seja pequena e capaz de ser suprida pela adição de goma arábica à solução de ensaio, já que este composto apresenta este tipo de íon em sua composição.

Dentre os íons de ferro, destaca-se a diferença promovida entre o íon ferroso (cátion bivalente) e o íon férrico (cátion trivalente), onde o primeiro funciona como um ativador e o segundo como inibidor. Ao se comparar as médias obtidas, é possível observar também que, apesar de próximas à atividade relativa do controle, muitos íons apresentaram um efeito significativo estatisticamente. Assim como para as lipases apresentadas neste trabalho, os íons Zn^{2+} (Benjamin e Pandey, 2001; Alkan *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Sun e Xu, 2009) e Fe^{3+} (Alkan *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2009; Sun e Xu, 2009) também apresentaram um efeito inibidor sobre lipases publicadas por outros autores. Entretanto, para outras lipases os mesmos íons se comportaram como ativadores, como no caso da lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 que se mostrou ativada pela presença de Fe^{3+} (Kumar *et al.*, 2012). Em relação aos

íons com atividade ativadora das lipases deste trabalho, destaca-se que o Mg^{2+} , sendo este reportado como ativador para uma série de outras lipases (Benjamin e Pandey, 2001; Sun *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012). Segundo Lessuisse e colaboradores (1993), o efeito de íons metálicos sobre a atividade das lipases é uma questão complexa de ser interpretada, porque resulta tanto de uma mudança na solubilidade e no comportamento dos ácidos graxos ionizados nas interfaces de atuação da enzima quanto em mudanças intrínsecas nas propriedades catalíticas da própria enzima.

Em relação a outros aditivos, observa-se que o extrato enzimático manteve sua atividade lipolítica funcional quando incubado com um amplo espectro de solventes orgânicos e surfactantes estudados (Tabela III.5). Destaca-se, entretanto, o efeito inibitório da adição de SDS, clorofórmio e 2-propanol, que provocaram uma perda de 96,2%, 14,2% e 9,7% da atividade lipolítica, respectivamente. Por ser um agente caotrópico, é possível que a adição de SDS promova o rompimento das ligações de hidrogênio que estabilizam a estrutura nativa da enzima, fazendo com que seja observada uma perda de funcionalidade. Um comportamento similar foi observado para as lipases de *Candida rugosa* (Benjamin e Pandey, 2001), *Rhizopus chinensis* (Sun e Xu, 2009; Sun *et al.*, 2009) e *Penicillium chrysogenum* (Kumar *et al.*, 2012).

3.6 Estabilidade térmica

O extrato enzimático bruto foi desativado termicamente. Como esperado, uma diminuição gradual da atividade catalítica foi observada com o aumento da temperatura (Figura II.8). O extrato enzimático bruto exibiu uma estabilidade expressiva a 30 e 40 °C com uma meia-vida calculada ($t_{1/2}$) de 109 e 65 h, respectivamente. Em temperaturas mais altas de 50, 60 e 70 °C, entretanto, a desnaturação da lipase foi mais pronunciada com meias-vidas de 4,8; 1,2 e 1,1 h, respectivamente. O tempo necessário para desativar 50% da atividade inicial da lipase de *B. gladioli* BRM58833 é maior do que o da lipase alcalina de *B. cepacia* (Dalal *et al.*, 2008) de 54 min a 50 °C e 46 min a 60 °C e menor que 3 h a 60 °C para *Bacillus tequilensis* (Verma *et al.*, 2020) e 4,5 h a 60 °C para a lipase de *B. subtilis* (Olusesan *et al.*, 2011).

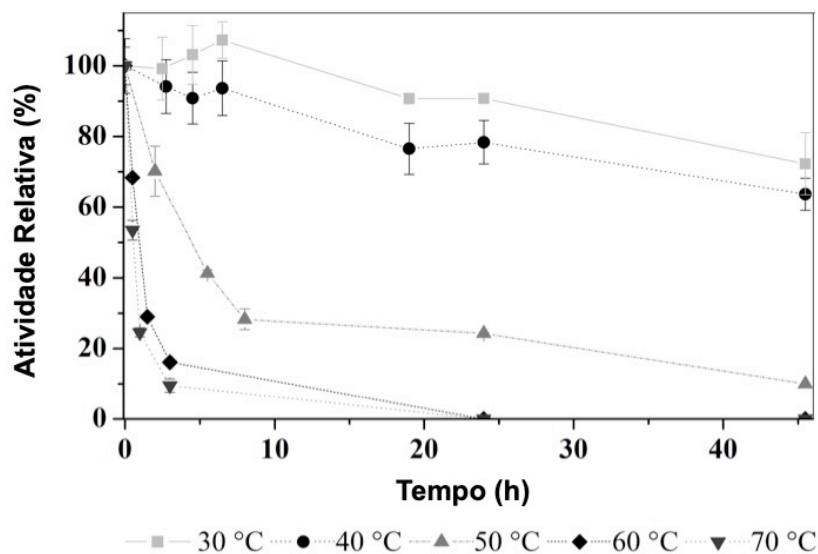


Figura III.8 Efeito da temperatura na estabilidade do extrato lipolítico bruto. As atividades foram determinadas pelo método de titulação usando trioleína como substrato a 50 ° C e pH 9,0

4. Conclusões

Este foi o primeiro estudo da produção de lipase de *Burkholderia gladioli* por fermentação em estado sólido. A produção de lipase foi otimizada, obtendo-se um aumento de 47% na atividade lipolítica, o que resultou em um extrato com uma das maiores atividades lipolíticas entre as lipases não purificadas produzidas por bactérias em fermentação em estado sólido. O extrato pode ser aplicado em uma ampla gama de aplicações industriais como um extrato bruto e barato sem a necessidade de purificação. Após caracterização e determinação das condições de ensaio mais adequadas, a atividade lipolítica foi 79% maior do que inicialmente. Foram obtidos altos valores de atividades que são comparáveis a lipases purificadas. Além disso, a lipase de *B. gladioli* BRM58833 apresentou alta atividade em amplas faixas de temperatura e pH alcalino e excelente tolerância à temperatura e solventes orgânicos. Em conjunto, estes resultados demonstram o potencial das lipases obtidas a partir do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 como catalisadores aplicáveis a processos de hidrólise e síntese de ésteres.

CAPÍTULO IV – SÍNTESE DE ÉSTERES ETÍLICOS A PARTIR DE SÓLIDOS FERMENTADOS POR *BURKHOLDERIA GLADIOLI* BRM58833: OTIMIZAÇÃO E REUSO

1. Objetivos

Neste trabalho buscou-se aplicar os sólidos fermentados obtidos do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM58833 para a síntese de biodiesel etílico, bem como otimizar as condições da reação de síntese e avaliar o potencial de reutilização destes biocatalisadores ao longo de sucessivos ciclos, objetivando a redução dos custos associados à produção do biodiesel.

2. Metodologia

2.1 Materiais Utilizados

Foram avaliados como substratos da reação de transesterificação: óleo de soja refinado (Soya), óleo de soja bruto, óleo de soja degomado, óleo de soja degomado enzimático (cedidos pela empresa Granol, Anápolis-GO), óleo de palma bruto variedade Tenera, óleo de palma bruto híbrido (cedidos pela empresa Denpasa, Belém-PA) e álcool etílico (Sigma).

2.2 Produção dos sólidos fermentados

Para todos os experimentos relatados neste capítulo foram empregados os sólidos fermentados liofilizados (SFL) como catalisadores da reação de transesterificação para síntese de ésteres etílicos. Os SFL foram obtidos do cultivo otimizado (Capítulo III) de *Burkholderia gladioli* BRM58833 em farelo de trigo por FES. As condições de cultivo foram as seguintes: temperatura 32,6 °C, umidade 65% obtida com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ ajustada para 0,9 com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8 (conforme item 2.3.1 , capítulo III).

2.3 Utilização de Diferentes Óleos para Síntese de Ésteres Etílicos

Avaliou-se a aplicação de diferentes óleos como substratos da reação de síntese. As reações de síntese foram conduzidas a 31,2 °C, 4,1% (m/m) de água adicionada ao meio reacional e carga enzimática de 1 g de SFL. A razão molar óleo:álcool etílico foi mantida em 1:1 (teor máximo de 33,33%). A síntese de ésteres etílicos foi avaliada após 120 h de reação conforme método descrito no item 2.7.

2.4 Otimização Das Condições De Síntese De Ésteres Etílicos

2.4.1 Temperatura e quantidade água

A etapa de otimização das condições de temperatura de reação e de quantidade de água adicionada ao meio reacional que favorecessem a síntese de ésteres etílicos foi feita por meio de planejamento fatorial do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR), originalmente descrito por Box e Wilson (1951) e utilizado com sucesso para otimização de processos por Myers e Montgomery (2002). Foram considerados cinco níveis e duas variáveis independentes na análise. O experimento foi conduzido conforme matriz gerada com duas variáveis e três repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos. O alfa de ortogonalidade utilizado foi de 1,41. As variáveis independentes consideradas foram: temperatura de reação variando de 19,5 °C a 44,9 °C (X_1) e quantidade de água adicionada ao meio reacional variando de 0 a 10% m/m (X_2). A razão molar álcool:óleo foi fixada em 1:1, sendo utilizados um total de 5 mmol de cada substrato por frasco de reação. A carga enzimática foi de 1 g de SFL por frasco. As reações foram conduzidas em frascos do tipo *erlenmeyer* sob agitação de 170 rpm em agitador orbital. A síntese de ésteres etílicos foi avaliada após 72 h de reação conforme método descrito no item 2.7.

A análise estatística dos dados experimentais obtidos foi feita utilizando o *software* Statística (v. 12.0). Foi considerado um nível de significância de 90% ($p < 0,1$) devido à variabilidade dos bioprocessos (Haaland 1989). Para validar as previsões do modelo, novas reações de síntese foram realizadas sob condições previstas pelos modelos.

2.4.2 Razão molar

Foram realizados experimentos para determinar a razão molar entre os reagentes que mais favorecesse a velocidade de síntese dos ésteres etílicos sem que fosse observado o efeito inibitório do álcool etílico. Deste modo, fixou-se a temperatura e a quantidade de água adicionada ao meio reacional conforme condições otimizadas. Foram avaliadas oito condições de razão molar álcool:óleo fixando-se a quantidade de óleo por reação em 5 mmol: 0,25:1 (1,25 mmol de álcool etílico); 0,5:1 (2,5 mmol de álcool etílico); 0,75:1 (3,75 mmol de álcool etílico); 1:1 (5 mmol de álcool etílico); 1,5:1 (7,5 mmol de álcool etílico); 2:1 (10 mmol de álcool etílico); 2,5:1 (12,5 mmol de álcool etílico); e 3:1 (15 mmol de álcool etílico). As reações foram conduzidas em frascos do tipo *erlenmeyer* sob agitação de 170 rpm em agitador orbital de bancada. A taxa de consumo de etanol ($\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}$) foi calculada a partir da quantificação de ésteres etílicos avaliada após 2 h de reação conforme método descrito no item 2.7.

2.5 Reação de Síntese de Ésteres Etílicos em Batelada Alimentada

Determinadas as melhores condições de reação para síntese de ésteres etílicos, procedeu-se com a etapa de escalonamento para uma reação com volume dez vezes superior. Para atingir a estequiometria da reação, o álcool etílico foi adicionado em um processo de batelada alimentada. Assim, foram adicionados ao vaso de reação 50 mmol de óleo e 50 mmol de álcool etílico (razão molar inicial de 1:1), a proporção otimizada de água e uma carga enzimática de 10 g de SFL. A vazão de alimentação do álcool etílico foi constante atendendo a velocidade inicial de consumo do etanol calculada na etapa anterior de otimização e foi cortada no momento em que a estequiometria da reação foi atingida. As reações foram conduzidas em frascos *erlenmeyer* a 170 rpm e temperatura conforme etapa de otimização anterior. A síntese de ésteres etílicos foi avaliada em onze tempos de reação distintos (0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 h) conforme método descrito no item 2.7.

2.6 Reutilização dos Sólidos Fermentados

A reação de síntese dos ésteres etílicos foi reproduzida por ciclos consecutivos de 120 h cada, conforme método em batelada alimentada descrito no item 2.5 desta seção. Após cada reação, o meio reacional foi coletado e filtrado em funil de Büchner com papel Whatmann nº 1 para recuperação dos SFL. Em seguida, os SFL foram transferidos para um novo meio reacional e reutilizados para a síntese de ésteres etílicos, que foram avaliados conforme método descrito no item 2.7.

Foi empregada uma análise estatística para verificar diferenças significativas entre amostras independentes após cada etapa de reutilização dos SFL em sucessivas reações de síntese de ésteres etílicos em batelada alimentada. Para isso, utilizou-se o teste de Tukey a 95% de probabilidade (Tukey, 1953).

2.7 Quantificação de Ésteres Etílicos e Produtos Intermediários

O cálculo dos teores de ésteres etílicos bem como de outros produtos intermediários da reação de síntese do biodiesel foi realizado através de quantificação em sistema de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (UPLC), conforme método adaptado de Holčapek e colaboradores (1999).

As alíquotas obtidas das reações de síntese foram tratadas em sistema *SpeedVac* para remoção do álcool etílico residual e, em seguida, pesou-se 15 mg do material resultante (mistura de FFA, MAG, DAG, TAG e FAEE) por *vial* de amostra. Este material foi, então, diluído em 1 mL de uma solução de 2-Propanol:Hexano 5:4 (v/v) e homogeneizado até que todo o analito fosse dissolvido na solução. As amostras preparadas foram mantidas a 15 °C e para cada corrida foi injetado 1 µL de amostra em sistema ACQUITY UPLC® H-Class para separação dos analitos. Utilizou-se a coluna ACQUITY UPLC® HSS C18 (100Å, 1,8 µm, 2,1 mm x 150 mm) acoplada à pré-coluna ACQUITY UPLC® HSS C18 VanGuard, (100Å, 1,8 µm, 2,1 mm x 5 mm). A fase móvel consistiu das soluções A (Ácido Trifluoroacético 0,1%), B (Acetonitrila 50%, Ácido Trifluoroacético 0,1%) e C (mistura de 50% Acetonitrila e 50% da solução 2-Propanol:Hexano 5:4 v/v, Ácido Trifluoroacético 0,1%) conforme gradiente de

15 min de: 1) condição inicial de equilíbrio 24% A e 76% B; 2) mistura constante de 24% A e 76% B por 2 min; 3) gradiente linear crescente de B de 76% a 100% até atingir 8,5 min; 4) gradiente linear crescente de C de 0 a 100% até atingir 10,5 min; 5) 100% C até atingir 12 min; 6) restabelecimento da condição inicial e equilíbrio para a próxima cromatografia com 24% A e 76% B até atingir 15 min. A vazão de fase móvel foi constante a 0,7 mL.min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida a 40 °C. A detecção dos analitos foi realizada por meio de Detector Evaporativo de Espalhamento de Luz (ELSD) com nebulizador no modo *cooling*, pressão do nitrogênio em 40 psi e temperatura do *drift tube* em 40 °C. A quantificação dos componentes de cada amostra foi realizada a partir das curvas obtidas para os padrões de referência correspondentes aos compostos mais abundantes no óleo de soja refinado. Para os triacilgliceróis dos óleos de soja e de palma, a curva foi construída com regressão de ajuste quadrático. Já para o restante dos analitos, as curvas foram construídas com regressão log-log linear. Os padrões utilizados são apresentados abaixo em ordem de eluição conforme método utilizado: 1) 1-Monopalmitina (C16:0); 2) Ácido linolênico (C18:3 $\Delta^{9, 12, 15}$); 3) 1-Monolinoleína (C18:2 $\Delta^{9, 12}$); 4) Ácido linoleico (C18:2 $\Delta^{9, 12}$); 5) 1-Monooleína (C18:1 Δ^9); 6) Ácido palmítico (C16:0); 7) Ácido oleico (C18:1 Δ^9); 8) 1-Monoestearina (C18:0); 9) Linolenato de etila (C18:3 $\Delta^{9, 12, 15}$); 10) Ácido esteárico (C18:0); 11) Linoleato de etila (C18:2 $\Delta^{9, 12}$); 12) Palmitato de etila (C16:0); 13) Oleato de etila (C18:1 Δ^9); 14) Estearato de etila (C18:0); 15) 1,3-Dioleína (C18:1 Δ^9); 16) 1,2/1,3-Dipalmitina (C16:0); 17) 1,3-Diestearina (C18:0); 18) Triacilgliceróis dos óleos de soja ou palma.

3. Resultados e Discussão

3.1 Utilização de Diferentes Óleos para Síntese de Ésteres Etilícos

Óleos refinados contêm menos impurezas e são ricos em triacilgliceróis. Estes são resultantes de um processamento industrial e, portanto, de maior valor comercial. A fim de mitigar os custos associados ao processo de síntese dos ésteres etílicos, decidiu-se avaliar a possibilidade de aplicação de outros óleos menos processados como substratos da reação. Assim, além do óleo de

soja refinado (OSR), foram avaliados o uso do óleo de soja bruto (OSB), do óleo de soja degomado (OSD), do óleo de soja degomado enzimático (OSE), do óleo de palma bruto variedade tenera (OPT) e do óleo de palma bruto variedade híbrido (OPH).

O OSB é resultante do processo de prensagem mecânica dos grãos de soja seguido do tratamento com solventes orgânicos para recuperação do óleo residual que permanece aderido à torta de soja. Em seguida, este óleo é misturado com o resultante de sucessivas prensagens e o material é denominado óleo bruto, que pode ser destinado ao refino. Uma das etapas de refino é a degomagem do óleo, onde este material é tratado para remoção de impurezas solúveis no óleo anidro, como fosfatídeos (lecitina de soja), proteínas e outras substâncias. A remoção destas impurezas é importante pois além de facilitar a proliferação de microrganismos e consequente degradação do óleo, estas impurezas podem precipitar durante o período de estocagem, fazendo com que o produto se torne de menor qualidade e seja menos atrativo ao consumidor final. A degomagem pode ser realizada por um processo tradicional com adição de água e ácido fosfórico (resultando no OSD) ou então por um processo enzimático com uso de fosfolipases (resultando no OSE) (Mandarino *et al.*, 2015).

O óleo de palma é um óleo vegetal de grande versatilidade, sendo destinado atualmente a diversos setores da indústria, como o de alimentos, cosméticos, detergentes e também para manufatura de graxas, lubrificantes e biodiesel. Ademais da versatilidade de aplicações do óleo produzido, o custo de produção do óleo de palma é inferior se comparado a outros óleos vegetais (Carter *et al.*, 2007), fazendo com que o dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) seja considerado uma planta de grande importância comercial. O óleo de palma é resultante do processo de prensagem mecânica do mesocarpo dos frutos de dendê. A variedade tenera de dendê é resultante de um cruzamento intra-específico entre as variedades Dura e Psifera de *Elaeis guineenses* e resulta em um óleo mais ácido, com maior índice de saturação e de alta viscosidade (OPT). Já o óleo de palma híbrido (OPH) é resultante da extração do óleo de frutos de dendê originados de um cruzamento interespecífico (*Elaeis guineenses* x *Elaeis*

oleífera) e é um óleo menos ácido do que a variedade *tenera*, apresentando menor quantidade de ácidos graxos saturados e maior fluidez.

As reações de síntese foram conduzidas mantendo a razão molar álcool:óleo sempre em 1:1 (teor máximo de 33,33%). Os valores de teores de ésteres etílicos obtidos para o uso de cada óleo são apresentados na Figura IV.1.

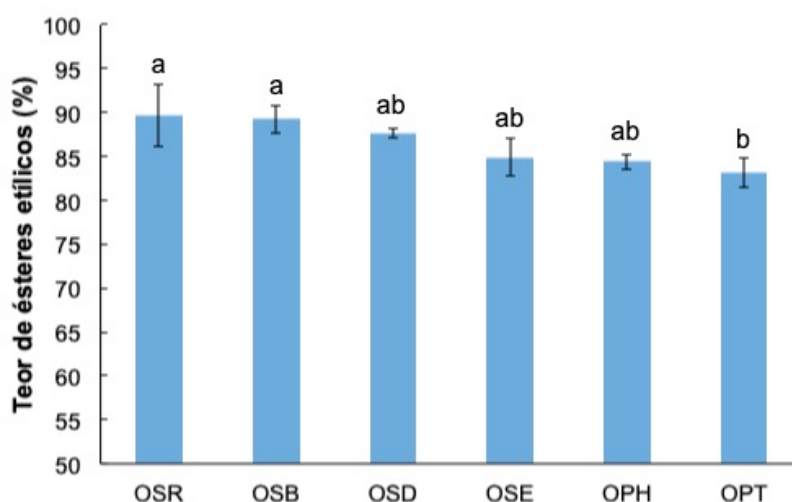


Figura IV.1. Teor de ésteres etílicos quando utilizados diferentes óleos como substrato. As letras acima das colunas representam a avaliação estatística (teste de Tukey, nível de significância 5%). O valor de 100% de conversão é referente à conversão máxima teórica possível (33,33%) para uma razão molar 1:1. OSR: óleo de soja refinado; OSB: óleo de soja bruto; OSD: óleo de soja degomado; OSE: óleo de soja degomado enzimático; OPT: óleo de palma bruto variedade *tenera*; e OPH: óleo de palma bruto variedade híbrido. Condições: 31,2 °C, 4,1% m/m água, razão molar álcool:óleo 1:1, carga enzimática de 1 g, agitação 170 rpm e 120 h de reação.

Para comparação entre amostras de diferentes óleos foi aplicado o teste de Tukey. Após 120 h de reação, o maior teor de ésteres etílicos foi observado com o uso de óleo de soja refinado, atingindo $89,7 \pm 3,6\%$ da máxima conversão possível. Entretanto, o teste de Tukey permite observar que apenas a condição com uso de óleo de palma variedade *tenera* foi estatisticamente diferente da condição com maior valor absoluto. Desta forma, revela-se o potencial do uso de óleos brutos para síntese de ésteres etílicos. Em especial, destacam-se as respostas obtidas para os óleos de palma, já que se tratam de óleos brutos de maior acidez e menor qualidade do que os óleos de soja.

Assim, foram selecionados os óleos de soja refinado e o óleo de palma híbrido para as etapas de otimização da síntese de ésteres etílicos.

3.2 Otimização Das Condições De Síntese De Ésteres Etílicos

Para otimização da síntese de ésteres etílicos com o uso de SFL obtidos do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM58833, avaliou-se a influência das variáveis temperatura e quantidade de água adicionada ao meio reacional por meio de um DCCR (Tabela IV.1)

Tabela IV.1. DCCR com variáveis reais e codificadas (entre parênteses) para otimização das condições de síntese de FAEE pelos SFL de *B. gladioli* BRM58833.

#	X ₁ Temperatura (°C)	X ₂ Quantidade de Água m/m (%)	Teor de Ésteres Etílicos (%)	
			Óleo de soja	Óleo de palma
1	23,2 (-1)	1,5 (-1)	18,3 ± 0,4	20,1 ± 2,1
2	23,2 (-1)	8,6 (1)	9,7 ± 0,4	24,5 ± 0,8
3	41,2 (1)	1,5 (-1)	22,6 ± 1,0	27,4 ± 1,6
4	41,2 (1)	8,6 (1)	3,3 ± 0,5	29,9 ± 0,7
5	19,5 (-1,41)	5,0 (0)	18,0 ± 0,9	26,2 ± 0,2
6	44,9 (1,41)	5,0 (0)	6,1 ± 0,8	30,9 ± 0,8
7	32,2 (0)	0,0 (-1,41)	11,3 ± 0,8	22,9 ± 0,4
8	32,2 (0)	10,0 (1,41)	8,7 ± 0,4	30,0 ± 2,2
9	32,2 (0)	5,0 (0)	24,9	29,9
10	32,2 (0)	5,0 (0)	25,5	29,4
11	32,2 (0)	5,0 (0)	24,2	23,1

As médias dos teores de ésteres etílicos obtidos para cada experimento foram inseridas no software Statística (v.12) e avaliadas considerando um nível de significância de 90% ($p < 0,1$), gerando uma superfície de resposta para o uso de cada óleo (Figura IV.2). A análise estatística demonstrou que ambas as variáveis influenciaram significativamente o teor de ésteres etílicos obtido da reação de síntese tanto no uso de óleo de soja refinado quanto no uso de óleo de palma variedade híbrido.

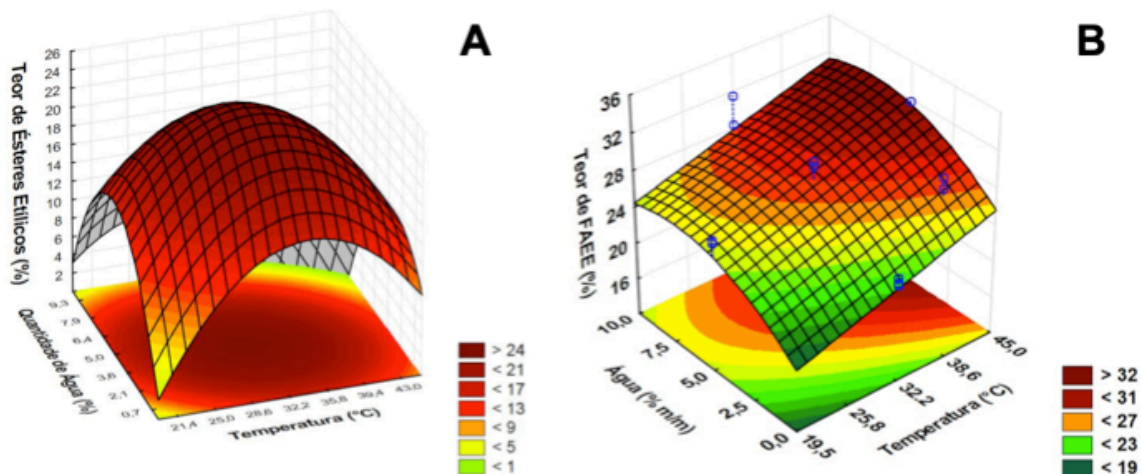


Figura IV.2. Superfícies de resposta obtidas para a síntese de ésteres etílicos em função da temperatura e da quantidade de água adicionada ao meio reacional contendo óleo de soja refinado (a) e óleo de palma variedade híbrido (b). Condições fixas de reação: razão molar álcool:óleo 1:1, agitação 170 rpm, 72 h de reação.

As funções $f(s)$ e $f(p)$ que descrevem a síntese de ésteres etílicos dadas as condições de reação para o óleo de soja refinado e para o óleo de palma variedade híbrido, respectivamente, são apresentadas nas Equações 1 e 2 com variáveis codificadas e considerando parâmetros estatisticamente significativos ($p < 0,1$).

$$f(s) = 24,82 - 7,00.X_2^2 - 5,52.X_1^2 - 3,83.X_2 - 2,97.X_1.X_2 - 1,88.X_1 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$f(p) = 28,04 + 2,45.X_1 + 2,015.X_2 - 1,53.X_2^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

A análise de variância (ANOVA) indicou que os modelos foram significativos e satisfazem os requisitos para a construção das superfícies de resposta (Figura IV.2). Além disso, a ANOVA aponta que os modelos são adequados para fins preditivos, já que em ambos os casos a relação de $F_{\text{calc}} / F_{\text{tab}}$ obtida foi superior a 3, conforme recomendado por Box (1978). Para o caso do óleo de soja, a ANOVA indicou, ainda, que o F_{calc} para a falta de ajuste foi maior do que o F_{tab} , o que tornaria o modelo não adequado. Entretanto, observa-se que o

valor do erro puro foi pequeno (o que indica boa reprodutibilidade dos dados obtidos) e, sendo este valor baixo, é encontrado um F_{calc} elevado. Além disso, a comparação dos valores preditos e observados revelou que o modelo para o óleo de soja não é adequado para prever a resposta em condições próximas às regiões axiais (extremidades das faixas avaliadas), mas para a região próxima ao ponto central a relação predito/observado demonstrou adequação para predição de respostas. Como a região de interesse é correspondente ao ponto predito de máximo (maior teor de ésteres etílicos) e este se encontra muito próximo à região do ponto central, o modelo pode ser utilizado para predições.

Para $f(s)$, encontrou-se o ponto de inflexão com máximo de teor de ésteres etílicos predito de 25,4% para as condições de temperatura de 31,2 °C ($X_1 = -0,106$) e quantidade de água adicionada ao meio reacional de 4,1% m/m ($X_2 = -0,252$). Assim, foi realizada a reação nas condições de validação encontrando-se um teor de ésteres etílicos de $24,5 \pm 0,3\%$. Este valor corresponde a um erro absoluto de -0,9% e um erro relativo de 3,6%. Já para $f(p)$, encontrou-se o ponto de inflexão com máximo de teor de ésteres etílicos predito de 32,7% para as condições de temperatura de 44,9 °C ($X_1 = 1,41$) e quantidade de água adicionada ao meio reacional de 7,3% m/m ($X_2 = 0,69$). Assim, foi realizada a reação nas condições de validação encontrando-se um teor de $29,4 \pm 0,9\%$, que foi correspondente a 88,2% do máximo teor de FAEE possível (33,33%) considerando uma razão molar 1:1. Assim, devido à boa correlação entre os valores preditos, os resultados empíricos obtidos e as análises de variância, os modelos gerados foram considerados válidos para descrever o processo de síntese de ésteres etílicos por SFL de *Burkholderia gladioli* BRM58833.

A temperatura que proporciona maior síntese de FAEE obtida por este trabalho foi próxima à obtida por trabalhos similares. Para os sólidos fermentados obtidos do cultivo de *Burkholderia cepacia* a temperatura ótima para transesterificação foi de 37 °C (Fernandes *et al.*, 2007), 40 °C para os sólidos fermentados de *Burkholderia cenocepacia* (Liu *et al.*, 2014) e 50 °C para a linhagem de *Burkholderia cepacia* LTEB11 (Salum *et al.*, 2010). Em relação à quantidade de água no meio reacional, sabe-se que sua adição é essencial para a manutenção da camada de solvatação da enzima. Entretanto, quando em excesso, pode acarretar um aumento da taxa de hidrólise em

detrimento da reação de transesterificação. Assim, existe uma quantidade ótima específica para cada lipase sendo às observadas neste trabalho de 4,1% e 7,3%, valores superiores ao encontrado por Salum *et al.* (2010) para os SFL de *B. cepacia*, de 1%.

Após terem sido padronizadas a temperatura e a quantidade de água adicionada ao meio reacional, avaliou-se o efeito do álcool etílico sobre a síntese de ésteres etílicos considerando diferentes razões molares iniciais. Devido à sua alta polaridade, o álcool etílico provoca a remoção das moléculas de água da camada de solvatação da enzima, promovendo um efeito desnaturante e prejudicando o bom funcionamento das lipases (Martínez-Ruiz *et al.*, 2008; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2009).

Além do fenômeno de desnaturação pela remoção da camada de solvatação, o álcool etílico, quando em excesso, pode promover uma inibição pelo substrato. Portanto, sendo substrato e inibidor das lipases responsáveis pela reação de síntese, o balanço da quantidade deste álcool deve ser avaliado. Uma das alternativas para se contornar este efeito inibitório é a adição de solventes orgânicos como cossolventes da reação, que atuam promovendo uma estabilização e proteção da estrutura nativa da enzima. A utilização de solventes orgânicos, entretanto, encarece e dificulta o escalonamento do processo para um nível industrial. Assim, para este trabalho propôs-se a otimização de uma reação conduzida na ausência de um cossolvente.

Após realização das reações referentes a diferentes condições iniciais de razão molar álcool:óleo, o teor de ésteres etílicos foi avaliado. Em seguida, baseado nos teores obtidos, foram calculadas as quantidades de álcool etílico consumidas em cada condição para as primeiras h de reação. A partir das quantidades (em μmol) de álcool etílico consumido, determinaram-se as taxas de consumo deste substrato (Figura IV.3).

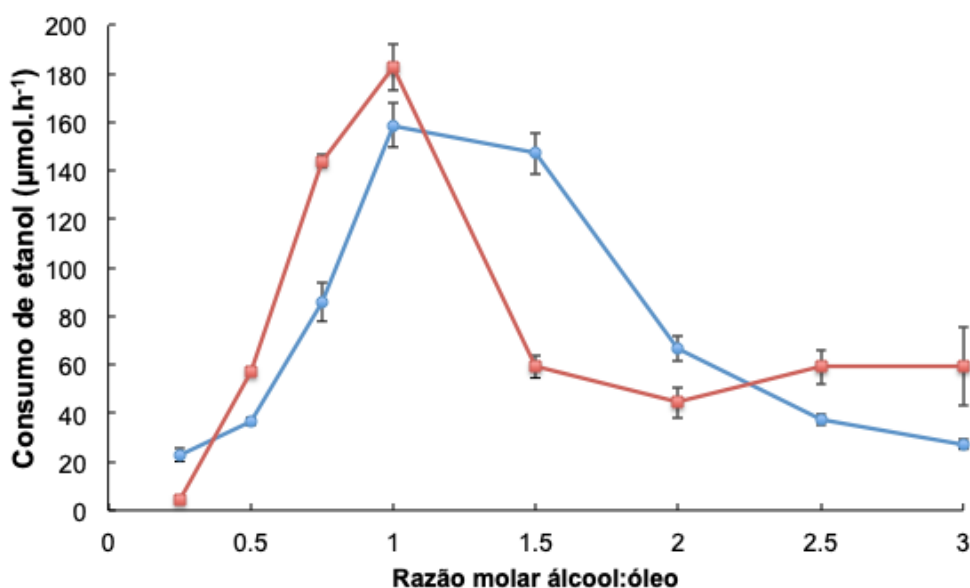


Figura IV.3. Efeito da concentração inicial de álcool etílico na reação de transesterificação usando óleos vegetais em condições otimizadas de temperatura e quantidade de água. Azul: óleo de soja refinado; Vermelho: óleo de palma híbrido.

Observou-se a formação de um perfil característico de inibição pelo substrato, caracterizado pela existência de uma concentração de substrato ótima localizada na inflexão da curva. Uma concentração de substrato muito baixa reduz o encontro da enzima com o substrato, reduzindo a formação do produto desejado. Já a utilização de uma concentração elevada do substrato promove o efeito inibitório do mesmo e acarreta em uma redução da taxa de consumo. Um efeito de inibição pelo substrato similar foi observado também por Liu e colaboradores (2014), que construíram um modelo de inibição e determinaram a concentração inicial ideal de álcool etílico na inflexão da curva, referente a uma razão molar inicial de 1,3:1 (álcool:óleo).

Comparando as diferentes curvas da Figura IV.3, percebe-se que o ponto de inflexão (correspondente à razão molar inicial ótima) é o mesmo tanto para o uso de óleo de soja quanto de palma. Assim, tem-se que uma razão molar de 1:1 (5 mmol de álcool etílico inicial) corresponde ao ponto com maior taxa de consumo deste substrato. Sendo assim, por considerar que 2 h de reação representam fidedignamente o comportamento da velocidade inicial da reação, optou-se por fixar a condição de razão molar inicial em 1:1 (5 mmol de óleo para 5 mmol de álcool etílico).

3.3 Síntese de Ésteres Etílicos em Batelada Alimentada

Estabelecidas as variáveis temperatura, quantidade de água adicionada ao meio reacional e a razão molar inicial, procedeu-se com etapa de adaptação do processo de síntese de ésteres etílicos a um sistema com alimentação controlada do álcool etílico para completar a estequiometria da reação.

Após extrapolação dos valores de consumo de álcool etílico para um volume de reação 10 vezes superior ao utilizado anteriormente (50 mmol de óleo), verificou-se que o consumo deste substrato era mantido em uma taxa constante de $90,75 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ e $104 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ para reações com óleo de soja refinado e óleo de palma híbrido, respectivamente. Considerando que seria necessária a alimentação de álcool etílico para completar a estequiometria da reação e, ainda, que a síntese de ésteres etílicos seria uma função apenas da concentração inicial do substrato e o efeito de inibição do mesmo, manteve-se uma vazão constante de álcool etílico equivalente à taxa de consumo inicial. Assim, após realização dos experimentos, os teores de ésteres etílicos foram calculados e são apresentados na Figura IV.4.

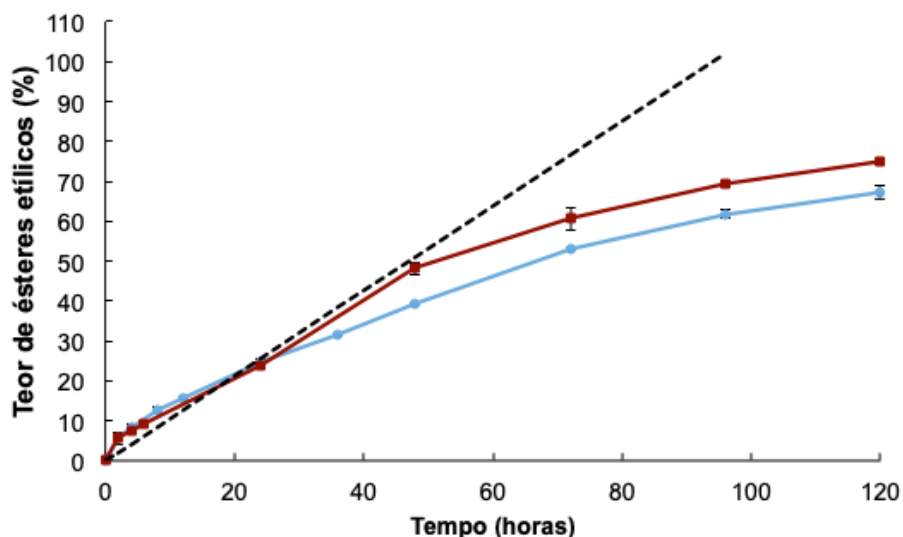


Figura IV.4. Teores de ésteres etílicos observados para a reação de transesterificação em condições de batelada alimentada. Azul: resposta empírica observada para o óleo de soja refinado; Vermelho: resposta empírica observada para o óleo de palma híbrido; Tracejado pontilhado: resposta teórica calculada considerando uma taxa de consumo do álcool etílico constante.

Analisando os resultados obtidos, tem-se que, para ambos os óleos e como previsto, existe uma linearidade na síntese de ésteres etílicos quando considerados os pontos iniciais da reação. Entretanto, ao final do processo é observada uma tendência de formação de platô, indicando que a taxa de consumo do álcool etílico é reduzida ao final da reação. Para explicar o fenômeno observado, foram propostos dois motivos principais: 1) ao se manter a concentração de álcool etílico constante, conforme o óleo vai sendo consumido, este passa a ser o substrato limitante na reação ao invés do álcool etílico. Com menos encontros entre enzima e substrato, a velocidade da reação tende a cair; 2) De modo a simplificar as análises, todos os cálculos e previsões matemáticas foram feitos apenas considerando o efeito do álcool etílico como substrato e inibidor da reação. Para que as previsões fossem mais próximas da realidade, deveriam ser considerados todos os efeitos em questão, como por exemplo a diminuição da concentração de óleo ao longo da reação e a formação dos ésteres etílicos e de outros intermediários da reação. Além do efeito inibitório do álcool etílico, outras questões ainda podem ser levantadas, como a possibilidade de perda de atividade catalítica devido à desnaturação da enzima.

3.4 Reutilização dos Sólidos Fermentados

Uma das grandes vantagens do uso de sólidos fermentados liofilizados (SFL) como biocatalisadores está no fato de estes funcionarem como uma espécie de enzima imobilizada, sem que para isso haja necessidade de uma etapa de purificação e imobilização da enzima em um suporte, já que o material pode ser facilmente aplicado logo após a etapa de FES. Além disso, devido à característica heterogênea da mistura dos SFL com o meio reacional, torna-se possível a recuperação e reutilização destes biocatalisadores em sucessivos ciclos, o que acaba por resultar em produtos de maior pureza e por reduzir os custos associados ao uso em um processo industrial (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Zdarta *et al.*, 2018).

Os SFL foram utilizados em reações sucessivas de 120 h sob as mesmas condições apresentadas anteriormente no processo de síntese de ésteres etílicos em batelada alimentada até que o teor de ésteres etílicos

relativo chegasse a 50% do valor obtido para o primeiro uso (Figura IV.5). Com base nos resultados obtidos, é possível observar uma queda acentuada ao longo dos ciclos de uso dos SFL na síntese de ésteres etílicos, especialmente para o uso de óleo de palma como substrato.

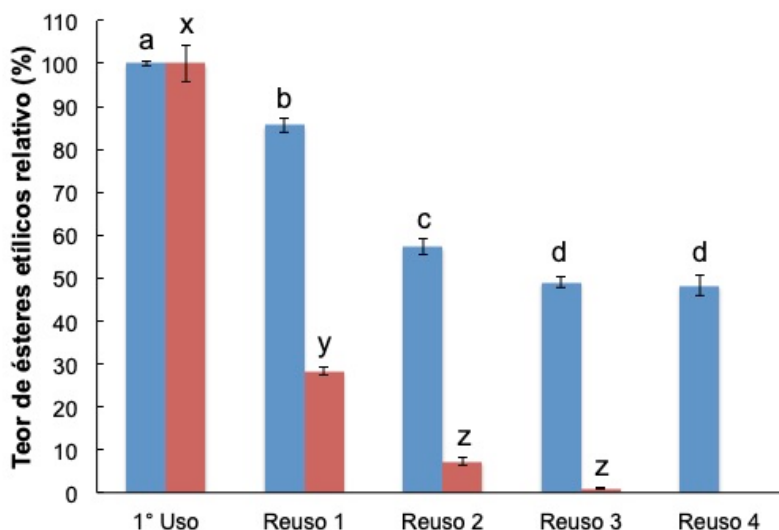


Figura IV.5. Reuso dos SFL obtidos do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 para reação de transesterificação em meio reacional otimizado e síntese de ésteres etílicos. Um ciclo de reação: 120 h. Azul: óleo de soja refinado (a, b, c, d – teste de Tukey, nível de significância 5%); Vermelho: óleo de palma híbrido (x, y, z – teste de Tukey, nível de significância 5%).

Quando os SFL foram utilizados em reações sucessivas de 120 h, os teores de ésteres etílicos relativos obtidos para a reação com óleo de soja foram de $85,6 \pm 1,7\%$, $57,3 \pm 1,9\%$, $49,0 \pm 1,2\%$ e $48,2 \pm 2,3\%$ para o primeiro, segundo, terceiro e quarto reusos, sucessivamente. Curiosamente, no quarto ciclo de utilização e último avaliado, o teor de ésteres etílicos obtido foi estatisticamente igual ao terceiro. Assim, para as condições otimizadas com o uso deste substrato, determinou-se uma meia vida de quatro ciclos de utilização para estes biocatalisadores. Para as lipases contidas nos sólidos fermentados obtidos do cultivo de *Burkholderia cenocepacia* em semente de girassol e bagaço de cana, foi possível reutilizar os catalisadores por apenas três ciclos além do inicial (Liu *et al.*, 2013;2014). Já para o sólido fermentado de *Burkholderia cepacia* LTEB11, foram necessários nove ciclos de reuso para atingir metade da atividade inicial (Salum *et al.*, 2010).

Para a reação com óleo de palma foi encontrado um teor de ésteres etílicos correspondente a $74,7 \pm 3,8\%$ para o primeiro uso dos SFL. Este valor é superior ao encontrado para a reação com óleo de soja, onde o valor máximo de ésteres etílicos foi de $56,0 \pm 0,3\%$, demonstrando o potencial do uso de óleos de menor valor agregado para a síntese de biodiesel. Entretanto, se avaliado o reuso destes SFL em óleo de palma, foram atingidos os valores relativos de $28,3 \pm 3,4\%$, $7,2 \pm 2,4\%$ e $0,9 \pm 0,2\%$ para o primeiro, segundo e terceiro reusos, sucessivamente. Desta forma, já no primeiro reuso o rendimento da reação para obtenção de ésteres etílicos cai para menos da metade, não sendo vantajoso o reuso dos SFL neste caso. O menor reaproveitamento dos SFL nesta reação pode estar relacionado ao uso de uma temperatura mais elevada e maiores quantidades de água em comparação com as condições otimizadas para o óleo de soja. É possível que a necessidade de temperaturas mais elevadas para reação com óleo de palma esteja relacionada às características do óleo, como maior índice de cadeias saturadas e maior viscosidade. Assim, temperaturas mais altas conferem maior fluidez ao substrato e tornam a transferência de massa mais efetiva com a agitação do meio reacional. Entretanto, como demonstrado para o extrato bruto obtido do mesmo cultivo, a estabilidade térmica a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ é inferior à observada para temperaturas próximas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Martins et al., 2021), promovendo maior desnaturação das lipases e menor reaproveitamento do biocatalisador.

Em uma análise mais global, foram quantificados os teores de outros analitos componentes do substrato (triacilgliceróis constituintes dos óleos) e aos produtos intermediários da reação de transesterificação, como diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. O resultado desta análise é exposto na Figura IV.6.

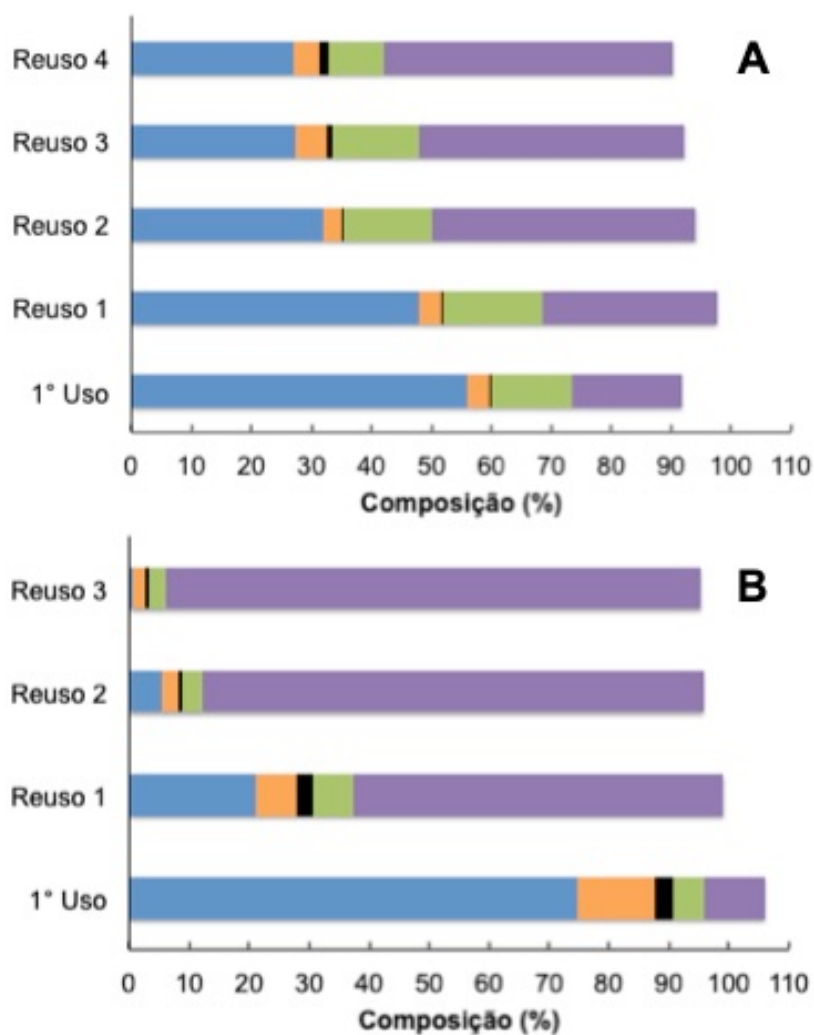


Figura IV.6. Quantificação dos analitos referentes aos substratos, produtos e intermediários da reação de transesterificação após a utilização dos SFL em sucessivos ciclos de utilização. Um ciclo de reação: 120 h. (A) Óleo de soja refinado e (B) Óleo de palma híbrido; Azul: ésteres etílicos; Laranja: ácidos graxos livres; Preto: monoacilgliceróis; Verde: diacilgliceróis; e Roxo: triacilgliceróis.

Ao avaliar os resultados obtidos na Figura IV.6, pode-se inferir algumas particularidades do mecanismo e condução da reação pelos SFL. A existência de monoacilgliceróis em menor quantidade do que diacilgliceróis, por exemplo, indica que esta forma (MAG) é mais reativa com a enzima utilizada, sendo rapidamente convertida em uma molécula de éster etílico e uma molécula de glicerol.

Outra questão interessante a se relatar é que foi alcançado um fechamento de massa acima de 90%, mas não foi atingido um fechamento total

da massa de amostra analisada. Parte do problema pode ser explicado pela dificuldade de quantificação dos triacilgliceróis. Por serem compostos da combinação de três cadeias carbônicas de diversos tamanhos, saturações e que podem estar associadas em diferentes combinações de posição, torna-se inviável a aquisição de vários padrões para que cada analito pudesse ser quantificado isoladamente, como no caso dos compostos mais simples e com menor variação (como ácidos graxos livres). Deste modo, a quantificação dos triacilgliceróis foi realizada considerando o conjunto de picos encontrados para a amostra de óleo de soja refinado como referência de padrão para a quantificação dos picos observados nas amostras obtidas das reações, o que pode ter acarretado em uma subestimação do teor destes compostos. Além disso, apesar de menos abundantes nas amostras, a presença de picos cromatográficos correspondentes a outros analitos sem padrão adquirido impossibilitou a quantificação destes pelo método utilizado, contribuindo para o não fechamento das massas observadas. Deste modo, para a quantificação foram considerados os compostos mais comumente abundantes no óleo de soja refinado e com padrão de referência adquirido. Para as reações em óleo de palma o fechamento de massa foi mais próximo a 100%, já que se trata de um óleo com menor variedade de compostos e, portanto, mais factível da identificação de cada pico cromatográfico.

A quantificação dos produtos e intermediários da reação demonstrou que ao longo dos sucessivos ciclos de utilização dos SFL o teor de ésteres etílicos produzidos decresce enquanto a quantidade de triacilgliceróis remanescentes aumenta. Considerando o uso do óleo de soja refinado e que o mesmo apresenta baixa acidez e é constituído essencialmente de triacilgliceróis, a quantificação de di- e monoacilgliceróis, bem como de ácidos graxos livres, na composição das amostras avaliadas indica o funcionamento dos SFL. O aumento do teor de composição e acúmulo destes intermediários ao longo dos ciclos de utilização dos SFL, entretanto, pode ser um indicativo do aumento da taxa de hidrólise em detrimento da reação de transesterificação, já que a cada reutilização a adição de novo meio reacional acaba por aumentar a quantidade de água, visto que esta tende a permanecer aderida ao sólido fermentado.

Além de um possível aumento na taxa de hidrólise em prejuízo da reação de transesterificação, a redução na taxa de síntese dos ésteres etílicos ao longo dos ciclos de uso dos SFL pode ser explicada por uma série de motivos: 1) a transferência dos SFL de um meio reacional para o seguinte pode acarretar em perda de sólido fermentado ao longo dos ciclos de utilização; 2) não houve nenhuma etapa de lavagem ou tratamento dos SFL intermediária à transferência destes de um meio reacional para o seguinte, acarretando na adição de produtos e intermediários de reação ao próximo ciclo de utilização já no tempo zero da reação seguinte. Este fenômeno pode ser responsável por uma alteração das constantes de equilíbrio da reação, afetando os parâmetros termodinâmicos do processo e reduzindo, conseqüentemente, o deslocamento do equilíbrio em direção à formação dos ésteres etílicos; 3) devido à característica hidrofóbica do meio reacional utilizado (ausência de cossolventes), o glicerol coproduzido na reação de transesterificação, que tem preferência por ambientes polares, tende a permanecer adsorvido na superfície dos SFL. O acúmulo de glicerol ao longo de sucessivos ciclos de utilização dos SFL pode dificultar a catálise (Galeano *et al.*, 2017); 4) a exposição dos SFL a longos e sucessivos períodos de reação a uma temperatura mais elevada pode levar a um processo de desnaturação das lipases, com conseqüente redução da formação de ésteres etílicos; e 5) a constante agitação do meio reacional pode ter provocado uma dessorção das enzimas da superfície dos SFL. Com os sucessivos ciclos de utilização destes biocatalisadores as lipases podem sofrer um processo de lixiviação, tendo sua concentração reduzida nos últimos ciclos de utilização.

4. Conclusões

O uso dos sólidos fermentados obtidos do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 em reações de transesterificação para a produção de ésteres etílicos foi otimizado. O uso de diferentes óleos vegetais de diferentes graus de processamento foi avaliado, revelando o potencial de produção de biodiesel a partir de óleos brutos com maior acidez e menor qualidade do que óleos refinados de maior valor agregado. Após otimização de alguns parâmetros da

reação de transesterificação, determinaram-se a temperatura, quantidade de água adicionada ao meio reacional e razão molar óleo:álcool ideais para o uso de óleo de soja refinado e óleo de palma variedade híbrido como substratos. Os maiores teores de ésteres etílicos foram de $67,3 \pm 1,7\%$ e $74,7 \pm 3,8\%$ para as reações em óleo de soja refinado e óleo de palma, respectivamente. Apesar de obtido um teor inferior para o uso de óleo de soja, foi possível reutilizar os sólidos fermentados por até quatro ciclos de reação mantendo aproximadamente 50% de atividade relativa inicial. Assim, destaca-se o potencial biotecnológico da diversidade microbológica do cerrado brasileiro para síntese de biodiesel. Como perspectiva futura, novas estratégias de síntese de biodiesel serão abordadas, como a utilização de óleo diesel como co-solvente e também a avaliação de métodos de retirada do glicerol adsorvido aos sólidos fermentados como etapa intermediária à reutilização para uma nova reação.

CAPÍTULO V – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *BURKHOLDERIA GLADIOLI* BRM58833

1. Objetivos

No capítulo III, a produção da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi otimizada e o extrato bruto obtido foi caracterizado, sendo a atividade lipolítica o resultado da ação conjunta de duas esterases e três lipases (Martins et al., 2021). Acredita-se que a lipase de *B. gladioli* BRM58833 (BGL), correspondente a uma massa molecular de 36 kDa, seja a principal responsável pela atividade lipolítica do extrato bruto. Assim, o objetivo deste trabalho foi obter uma fração purificada de BGL e caracterizá-la quanto às melhores condições para reações de hidrólise. Desta forma, espera-se compreender a relevância do aporte lipolítico de BGL ao extrato bruto obtido anteriormente, além de propor uma aplicação biotecnológica de destinação adequada às suas melhores condições de catálise.

2. Metodologia

2.1 Produção da lipase

Para purificação da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi utilizado o extrato bruto obtido da otimização do cultivo da bactéria em farelo de trigo por fermentação em estado sólido, conforme descrito no capítulo III deste trabalho. As condições de cultivo foram as seguintes: temperatura 32,6 °C, umidade 65% obtida com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ ajustada para 0,9 com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8 (conforme item 2.3.1 , capítulo III).

2.2 Ensaios enzimáticos para determinação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica das frações obtidas foi determinada conforme descrito nos itens 2.7.1 (método colorimétrico) e 2.7.2 (método titulométrico) do

capítulo I. Para o método colorimétrico, entretanto, foi considerado o uso de microplacas ao invés de cubetas para a leitura.

2.3 Determinação da concentração de proteínas totais

A atividade lipolítica de cada fração purificada foi expressa em atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$). Para isso, a determinação da concentração protéica de cada solução enzimática foi obtida utilizando-se o *BCA Protein Assay kit* (Sigma Aldrich) conforme instruções do fabricante.

2.4 Purificação de lipases

2.4.1 Remoção do Triton X-100

Para a remoção do Triton X-100 das amostras de extrato bruto e da fração advinda da purificação em Octil Sepharose foi realizado um tratamento com Amberlite XAD-2, conforme métodos adaptados de Holloway (1973) e Cheetam (1979). Amberlite XAD-2 é uma resina de interação hidrofóbica com capacidade de adsorver os monômeros do surfactante em questão sem que as lipases do extrato enzimático permaneçam retidas.

O procedimento foi realizado com uma lavagem inicial abundante da resina em água destilada. Em seguida, o material é equilibrado em tampão fosfato de sódio $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,0 por 30 min sob agitação. Após etapa de equilíbrio, o material é filtrado para remover o tampão e é adicionada a amostra de interesse, que permanece incubada com a resina sob agitação suave por 1 hora a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A proporção utilizada foi de 0,3 g de Amberlite XAD-2 para cada 1 mL de amostra. Após tratamento, a amostra é filtrada e utilizada conforme sua destinação.

2.4.2 Adsorção interfacial em Octil Sepharose

O extrato bruto tratado com Amberlite XAD-2 foi oferecido a Octil Sepharose em uma proporção 1:10 suporte:solução (1 g de resina para 10 mL de solução enzimática) e incubado a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em tampão fosfato $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 7,0 sob agitação moderada (Bastida et al., 1998). A adsorção da lipase foi monitorada tanto na suspensão quanto no sobrenadante, os quais foram medidos periodicamente pelo ensaio colorimétrico de atividade lipolítica. Ao

final do processo, a resina foi filtrada e lavada abundantemente com tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} em pH 7,0. A eluição foi feita tampão fosfato 50 mmol.L^{-1} em pH 7,0 acrescido de Triton X-100 0,2% também considerando uma proporção de 1:10 suporte:solução.

2.5 SDS-PAGE

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e zimograma, as amostras foram tratadas conforme procedimento descrito no item 2.13 do capítulo III.

2.6 Avaliação do efeito da temperatura e pH

A avaliação do efeito da temperatura e do pH sobre a atividade lipolítica foi realizada conforme procedimento descrito no item 2.8 do Capítulo III.

2.7 Efeito do comprimento da cadeia carbônica do substrato

A lipase purificada teve sua atividade lipolítica avaliada frente a substratos sintéticos e naturais com diferentes tamanhos de cadeia carbônica. O procedimento foi realizado conforme descrito no item 2.9 do capítulo III.

2.8 Efeito de surfactantes e solventes orgânicos

A lipase teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes surfactantes (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100, PEG-6000 e CHAPS) e solventes (acetona, acetonitrila, éter dietílico, *n*-heptano, *n*-hexano, piridina, tolueno, metanol, etanol, 2-propanol e *t*-butanol) conforme procedimento descrito no item 2.10 do capítulo III.

2.9 Efeito de íons

A lipase teve sua atividade lipolítica avaliada frente a incubação com diferentes íons. Os íons avaliados foram derivados dos seguintes sais preparados em água a 200 mmol.L^{-1} : AgNO_3 , $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeCl_3 , FeSO_4 , KCl , KF , KI , LiCl , MgCl_2 , MnCl_2 , NaCl , NiSO_4 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e ZnSO_4 . Avaliou-se também a influência do agente quelante EDTA 200 mmol.L^{-1} . O procedimento foi realizado conforme descrito no item 2.11 do capítulo III.

2.10 Estabilidade térmica

A lipase purificada foi inativada a 30, 40, 50, 60 e 70 °C e as atividades residuais foram medidas periodicamente ao longo do tempo. A meia-vida correspondente a cada temperatura foi estimada considerando as atividades residuais em função do tempo conforme o modelo de Arrhenius para uma reação de primeira ordem.

2.11 Parâmetros cinéticos: Km e V_{máx}

A influência da concentração de substrato nas velocidades de reação foi determinada com trioleína como substrato a pH 9,0 e 50 °C pelo método titulométrico. A enzima purificada foi incubada com trioleína emulsificada com concentrações variando de 0,78 a 100 mmol·L⁻¹. Os parâmetros cinéticos V_{máx} (velocidade máxima) e constante de Michaelis (Km) foram estimados a partir da linearização da curva pelo método de Lineweaver-Burk.

2.12 Análises Estatísticas

Para avaliar o efeito de íons, surfactantes e solventes orgânicos sobre a atividade lipolítica da lipase purificada obtida, empregou-se o teste de hipótese para igualdade de médias com variâncias estatisticamente iguais. Para comparação foi tido como referência sempre o resultado obtido para o controle (incubação com água destilada). A análise foi realizada considerando amostras independentes e um nível de significância de 5%.

3. Resultados e Discussão

3.1 Purificação da lipase de *B. gladioli* BRM58833

Como previamente evidenciado, o Triton X-100 demonstrou papel fundamental na extração de lipases obtidas do cultivo otimizado de *Burkholderia gladioli* BRM58833 em farelo de trigo por fermentação em estado sólido. Após diversas tentativas mal sucedidas de purificação da lipase por diferentes técnicas cromatográficas, concluiu-se que este surfactante poderia ser o responsável pela dificuldade de interação da enzima com as resinas cromatográficas testadas (dados não mostrados). Assim, determinou-se a

necessidade de uma etapa de remoção do Triton X-100. Após tratamento com a resina Amberlite XAD-2, obteve-se um extrato bruto livre do surfactante e com uma atividade específica 38% maior que a inicial.

O extrato bruto livre de Triton X-100 foi, então, oferecido à resina cromatográfica Octil Sepharose. Após 2 h sob leve agitação, a atividade lipolítica foi estabilizada em $23,6 \pm 1,1 \text{ U.mL}^{-1}$ na suspensão (resina octil e solução) e em $2,4 \pm 0,4 \text{ U.mL}^{-1}$ no sobrenadante (sem a presença da resina octil), significando que 89,9% das lipases estavam adsorvidas à superfície da resina cromatográfica. Apesar de utilizar uma resina cromatográfica comumente empregada para cromatografias de interação hidrofóbica, este método funciona como uma espécie de cromatografia de afinidade para lipases quando realizado em tampões com baixa força iônica. Assim, após filtragem e lavagem da resina cromatográfica para retirada de impurezas, as lipases foram eluídas da Octil Sepharose com Triton 0,2%. Em seguida, para que a caracterização da lipase fosse realizada livre de Triton X-100, a amostra foi novamente tratada com a resina Amberlite XAD-2. A fração purificada obtida foi denominada de Octil XAD-2.

Como demonstrado na Tabela V.1, o processo de purificação permitiu a um aumento de 55,3 vezes na atividade específica com um rendimento de 13,9% em relação ao extrato bruto inicial.

Tabela V.1. Etapas de purificação da lipase produzida por *Burkholderia gladioli* BRM58833 por fermentação em estado sólido em farelo de trigo.

Etapas de purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	6714,9	116298,0	17,3	1,0	100,0
Amberlite XAD-2	2837,8	67596,0	23,8	1,4	58,1
Octil Sepharose	17,7	17865,0	1008,1	58,2	15,4
Octil XAD-2	16,9	16164,0	957,5	55,3	13,9

Como demonstrado na análise proteômica do extrato bruto (Martins et al., 2021), é interessante ressaltar que a atividade lipolítica do extrato bruto é resultado da ação conjunta de mais de uma carboxilesterase. Este fato é evidenciado na visualização de três bandas de atividade lipolítica no zimograma apresentado na Figura V.1 (linha 4). Apesar de não ter alcançado o grau de pureza ideal (apenas uma banda proteica), o processo de purificação foi capaz de isolar apenas uma lipase componente do extrato bruto original, possibilitando o seu estudo e caracterização da capacidade catalítica de forma individualizada. Como esperado para uma lipase de *Burkholderia*, a banda em questão apresentou um tamanho em torno de 36 kDa, correspondente à lipase BGL (*Burkholderia gladioli* lipase). Trata-se de uma lipase verdadeira, pertencente à família I, subfamília I.2 de enzimas lipolíticas de origem bacteriana (Kovacic et al. 2019) com expressão dependente da coexpressão de sua foldase específica (Jaeger, 2002; Rosenau, 2004). Devido à alta atividade específica obtida para a fração BGL, pode-se dizer que esta é uma das maiores responsáveis pela atividade lipolítica do extrato bruto.

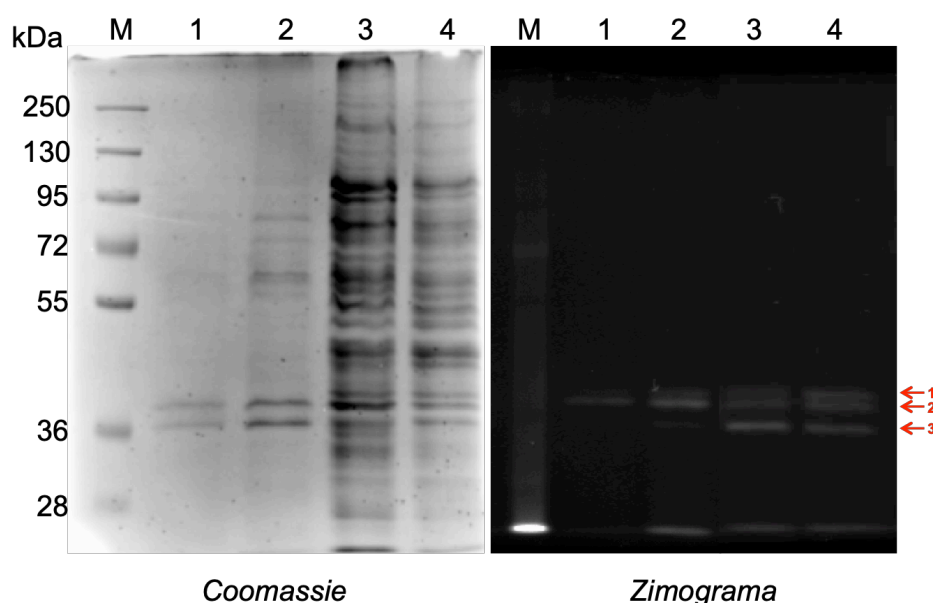


Figura V.1. SDS-PAGE e zimograma das frações relativas ao processo de purificação. M: marcador de massa molecular; 1: BGL; 2: Fração eluída da Octil Sepharose; 3: Extrato bruto após tratamento com Amberlite XAD-2; 4: Extrato bruto.

3.2 Atividade frente a diferentes substratos

Após a purificação de BGL, avaliaram-se as condições de ensaio que resultassem em uma maior atividade lipolítica. Inicialmente foi analisada a preferência de BGL por substratos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (Figura V.2).

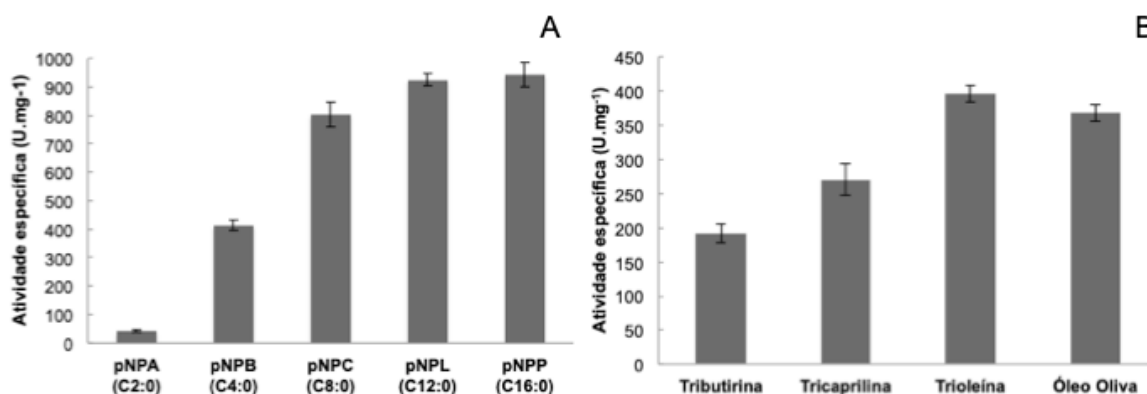


Figura V.2. Atividade lipolítica de BGL frente a substratos sintéticos (A) e naturais (B). Para os substratos sintéticos foi utilizado o método colorimétrico de determinação da atividade lipolítica. Para os substratos naturais foi utilizado o método titulométrico de determinação da atividade lipolítica. pNPA: acetato de *p*-nitrofenila (C2:0); pNPB: butirato de *p*-nitrofenila (C4:0); pNPC: caprilato de *p*-nitrofenila (C8:0); pNPL: laurato de *p*-nitrofenila (C12:0); e pNPP: palmitato de *p*-nitrofenila (C16:0).

Sendo BGL uma lipase verdadeira, esperava-se que a fração purificada apresentasse atividade lipolítica frente tanto a substratos de cadeia longa quanto de cadeia curta. De fato, os resultados obtidos demonstram que tanto para substratos sintéticos quanto para substratos naturais houve uma preferência por cadeias carbônicas longas. Este comportamento foi similar ao observado para o extrato bruto (item 3.5 do capítulo III), sendo as maiores atividades lipolíticas obtidas para o pNPP ($943,8 \pm 42,6 \text{ U.mg}^{-1}$) e para a trioleína ($396,0 \pm 12,2 \text{ U.mg}^{-1}$).

3.3 Efeito de íons, surfactantes e solventes

A Tabela V.2 apresenta o efeito de solventes orgânicos, surfactantes e de íons sobre a atividade lipolítica de BGL.

De modo geral, pode-se dizer que BGL se comportou de forma positiva quando na presença de uma variedade de compostos. Destacam-se como inibidores, entretanto, o nitrato de prata (AgNO_3), o sulfato de cobre (CuSO_4) e o cloreto de ferro III (FeCl_3), promovendo uma perda de atividade catalítica de 43,9%, 31,2% e 15,3%, respectivamente. É interessante notar que, diferentemente do observado para o extrato bruto (item 3.5 do capítulo III), o EDTA e o sulfato de zinco (ZnSO_4) não promoveram uma inibição tão significativa na atividade lipolítica de BGL. Em relação a ativadores, destacam-se os mesmos observados para o extrato bruto: o cloreto de magnésio (MgCl_2), o sulfato de ferro II (FeSO_4) e o cloreto de bário (BaCl_2) com uma atividade relativa de 117,4%, 108,7% e 108,4%, respectivamente. O íon Mg^{2+} já foi reportado como ativador para uma série de outras lipases, como as de *Candida rugosa*, *Rhizopus chinensis* and *Penicillium chrysogenum* (Benjamin e Pandey, 2001; Sun *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012).

Observou-se que BGL manteve sua atividade lipolítica diante de diversos solventes orgânicos e surfactantes. Como inibidor destaca-se o SDS, sendo capaz de promover uma perda catalítica de 93,1%. Por outro lado, o Triton X-100 foi responsável por um ganho de 14,8% em atividade lipolítica. Este fenômeno de ativação por Triton X-100 pode explicar a maior atividade lipolítica da fração cromatográfica eluída da Octil Sepharose, sendo que após o tratamento com Amberlite XAD-2 para retirada deste surfactante a atividade específica foi ligeiramente menor.

Tabela V.2. Efeito de aditivos sobre a atividade lipolítica de BGL. Aditivos marcados com um asterisco foram estatisticamente diferentes do controle (teste-t, nível de significância 5%). Tempo de incubação: 5 min. Método de análise: hidrólise do pNPP a 37 °C e pH 7.0

Aditivos		Atividade Relativa (%)	Aditivos		Atividade Relativa (%)
Controle		100,0 ± 3,9			
Compostos (10 mmol·L⁻¹)			Solventes (10% v/v)		
*	AgNO ₃	56,1 ± 2,5	*	Acetona	76,2 ± 5,2
*	Al ₂ (SO ₄) ₃	93,8 ± 4,9	*	Acetonitrila	86,8 ± 2,8
*	BaCl ₂	108,4 ± 2,8		Éter Dietílico	98,2 ± 6,2
	CaCl ₂	105,8 ± 5,5	*	<i>n</i> -Heptano	116,0 ± 10,2
	CoCl ₂	105,7 ± 5,9		<i>n</i> -Hexano	105,5 ± 6,7
*	CuSO ₄	68,8 ± 4,7	*	Piridina	92,6 ± 5,2
*	FeCl ₃	84,7 ± 6,8		Tolueno	100,3 ± 5,7
*	FeSO ₄	108,7 ± 6,9		Metanol	100,1 ± 5,4
	KCl	96,5 ± 3,5		Etanol	102,5 ± 5,8
	KF	100,9 ± 2,9		2-Propanol	105,4 ± 5,7
	KI	98,3 ± 4,1	*	<i>t</i> -Butanol	87,4 ± 8,2
	LiCl	101,2 ± 2,6	Surfactantes (1% m/v)		
*	MgCl ₂	117,4 ± 7,6	*	CHAPS	77,4 ± 2,6
	MnCl ₂	100,3 ± 6,0		Goma Arábica	97,5 ± 6,6
	NaCl	94,9 ± 5,5	*	PEG-6000	106,0 ± 4,1
*	NiSO ₄	85,0 ± 4,9	*	Triton X-100	114,8 ± 6,7
*	Pb(NO ₃) ₂	77,9 ± 6,0	*	Tween 20	92,5 ± 5,5
*	ZnSO ₄	93,2 ± 5,1	*	Tween 80	59,2 ± 2,9
	EDTA	96,2 ± 6,1	*	SDS	6,9 ± 0,6

Em relação aos solventes, observou-se um efeito inibitório da adição de acetona e e acetonitrila em 23,8% e 13,2%, respectivamente. A acetona é um conhecido solvente utilizado em protocolos de precipitação de proteínas, sendo responsável por reduzir a constante dielétrica do meio, o que acaba por favorecer interações proteína-proteína ao invés de proteína-água. Com a perda de moléculas de água que formam a camada de solvatação das proteínas a estrutura se torna insolúvel e precipita, impedindo que a enzima desempenhe

seu papel catalítico. A atividade lipolítica de BGL não sofreu alterações significativas quando em presença de álcoois de cadeia curta, como metanol e o etanol, o que representa uma vantagem para seu uso em reações de alcoólise. Já em contato com *n*-heptano, a atividade catalítica da enzima foi incrementada em 16% sendo essa uma característica desejável para uso de BGL em meios aquo-restritos, como utilizado para reações de síntese. Ainda que menor, o mesmo efeito ativador foi observado para o extrato bruto na presença deste solvente (item 3.5 do capítulo III).

3.4 Efeito da temperatura e do pH

Para determinação das melhores condições de temperatura e pH para a reação de hidrólise, julgou-se mais apropriado a utilização do método titulométrico devido a limitações do método colorimétrico quanto a diferentes valores de pH. Assim, a trioleína foi utilizada como substrato para a determinação das melhores condições de pH e temperatura de ensaio.

Para a determinação do melhor pH de atuação das lipases obtidas, fixou-se a temperatura em 37 °C e foram avaliados os valores de pH em 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0; 9,5 e 10,0 (Figura V.3a). Valores de pH ácidos não foram avaliados devido à limitações da técnica. Entretanto, avaliando-se a tendência apresentada por BGL é notável a preferência por uma faixa de pH alcalina, sendo a maior atividade observada em pH 9,0. Um perfil similar foi obtido para o extrato bruto (item 3.5 do capítulo III), o que sugere a importância da contribuição de BGL para a atividade lipolítica observada no extrato bruto.

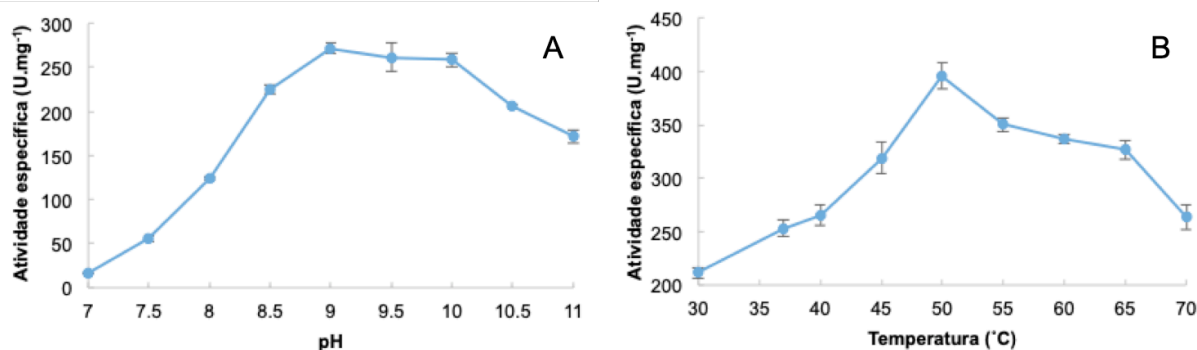


Figura V.3. Efeitos do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade lipolítica de BGL. Método de análise: hidrólise da trioleína (titulométrico).

Seguindo o mesmo procedimento para determinação da melhor temperatura de atuação das lipases obtidas, fixou-se o pH em 9,0 e foram avaliadas as temperaturas de 32; 37; 40; 45; 50; 55; 60; 65 e 70 °C (Figura V.3b). A temperatura com maior atuação das lipases foi determinada em 50 °C, sendo que a enzima manteve até 50% de sua atividade máxima por toda a faixa de temperatura avaliada. A atividade lipolítica de BGL apresentou o mesmo perfil observado para o extrato bruto (item 3.5, capítulo III), demonstrando mais uma vez a importante contribuição desta enzima para a atividade lipolítica conjunta das carboxiesterases presentes no secretoma de *B. gladioli* BRM58833.

3.5 Determinação de parâmetros cinéticos: K_m e $V_{máx}$

Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram estimados a partir da equação de Michaelis-Menten e da linearização utilizando o plot de Lineweaver-Burk considerando trioleína como substrato variando de 0,78 a 100 mmol.L⁻¹ (Figura V.4). O $V_{máx}$ aparente determinado foi $5,47 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹.min⁻¹ e o valor de K_m aparente obtido foi $1,39 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹, com um $R^2 = 0,99$.

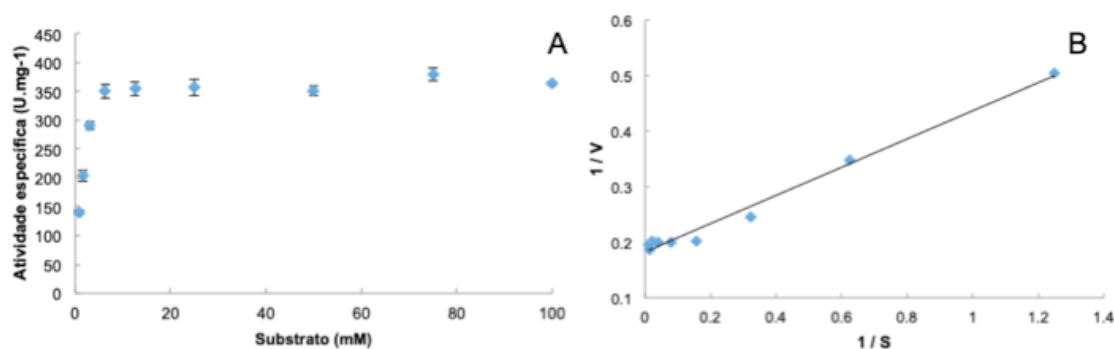


Figura V.4. Cinética michaeliana de BGL. Velocidade de reação versus concentração do substrato (A) e linearização de Lineweaver-Burk ($y = 0,2541x + 0,1828$; $R^2 = 0,99$) (B). Método de análise: hidrólise da trioleína (titulométrico).

O K_m aparente observado de BGL é menor do que o relatado para outras lipases, indicando que ela tem uma alta afinidade para trioleína. Tran e Chang (2014), usando uma lipase de *Burkholderia* sp. (imobilizada em Celite) e

o azeite de oliva como substrato, atingiram valores estimados de V_{max} e K_m de $0,61 \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $7,93 \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente. Borkar et al. (2009) avaliaram uma lipase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* e encontraram um valor de K_m de $1,11.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ com trioleína e $3,7.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ com pNPP como substrato. Os valores de V_{max} foram calculados em $0,055 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para trioleína e $0,189 \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ para pNPP. A lipase alcalina de *B. gladioli* avaliada em éster de ácido graxo de *p*-nitrofenol C18 atingiu o valor K_m de $1,65.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (Zhu et al., 2019). Demera et al. (2019) trabalhando com um extrato lipolítico de *Guehomyces pullulans* e pNPP como substrato, encontraram um V_{max} e um K_m de $6,7.10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ e $3,68 \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente e considerou a cinética obtida dentro dos parâmetros da faixa de lipases industriais (10^{-1} – 10^{-5}). É importante notar, no entanto, que as lipases geralmente apresentam maior afinidade para ésteres de *p*-nitrofenila do que triglicerídeos e que não há substrato universal ou ensaio para quantificar a atividade da lipase, tornando prejudicada a comparação dos parâmetros cinéticos e afinidade do substrato.

3.6 Estabilidade térmica

O efeito de diferentes temperaturas nas características termodinâmicas de BGL, como a constante de desnaturação (k) e a meia-vida ($t_{1/2}$), indicam que a lipase foi desativada termicamente. Como esperado, uma diminuição gradual da atividade catalítica foi observada com o aumento da temperatura (Figura V.5). BGL exibiu uma estabilidade expressiva a 30 e 40 °C com uma meia-vida calculada de 185,4 e 113,9 h, respectivamente. Em temperaturas mais altas de 50, 60 e 70 °C, entretanto, a desnaturação da lipase foi mais pronunciada com meias-vidas de 23,5; 1,3 e 0,4 h, respectivamente. É importante notar, entretanto, que a termoestabilidade pode ser influenciada por outros fatores, como pH e presença de íons metálicos. O padrão de inativação observado foi muito similar ao encontrado para o extrato bruto. Com relação às meias-vidas, foram alcançados valores maiores para a enzima purificada dos que os observados para o extrato bruto, com exceção a 70 °C (item 3.6, capítulo III).

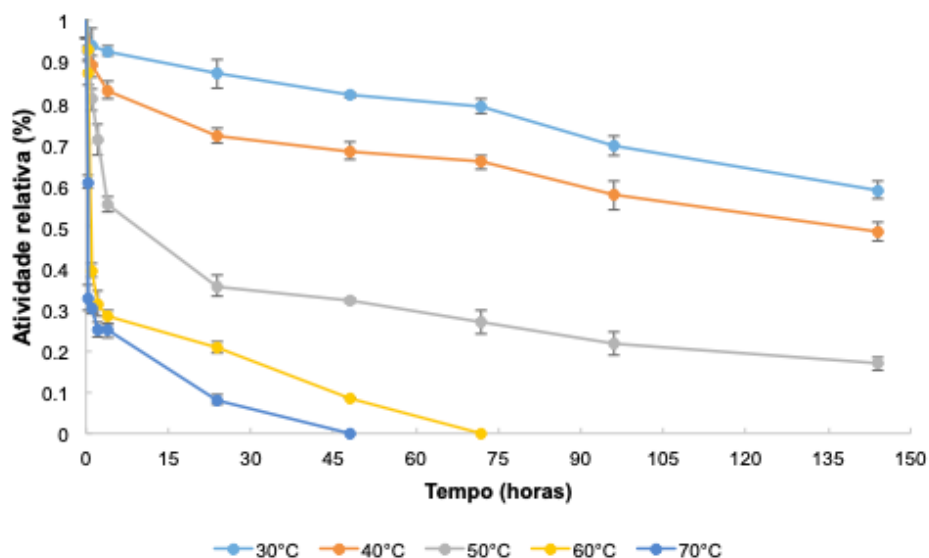


Figura V.5. Perfil de inativação de BGL a diferentes temperaturas. Método de análise: hidrólise da trioleína (titulométrico).

4. Conclusões

Após o processo de purificação, obteve-se uma fração com alto grau de pureza da lipase BGL, sendo observada uma banda única de atividade na análise por zimograma. A fração obtida ao final do processo foi correspondente a um aumento demais de 55 vezes em fator de purificação e foi correspondente a uma atividade específica de $957,5 \text{ U.mg}^{-1}$, valor comparável a outras lipases apresentadas na literatura. BGL purificada foi mais ativa contra substratos de cadeia longa, preferindo catalisar a hidrólise de *p*NPP e trioleína. A lipase foi inibida pelos compostos AgNO_3 , CuSO_4 e FeCl_3 . Como principais ativadores destacaram-se o MgCl_2 , FeSO_4 e BaCl_2 , os mesmos encontrados para a análise com o extrato bruto. Assim como observado para o extrato bruto, a atividade lipolítica foi mais elevada em condições de pH 9,0 e 50 °C, corroborando mais uma vez o protagonismo de BGL para a atividade lipolítica expressa por *B. gladioli* BRM58833. O K_m obtido para a enzima demonstra grande afinidade desta por trioleína. Além disso, BGL foi estável por uma extensa faixa de temperatura. Assim, destaca-se o potencial de aplicação de BGL a processos biotecnológicos de interesse industrial.

CAPÍTULO VI – IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DA LIPASE DE *BURKHOLDERIA GLADIOLI* BRM58833 PARA PRODUÇÃO DE ÔMEGA-3 POR HIDRÓLISE DE ÓLEO DE PEIXE

1. Objetivos

A imobilização da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 por adsorção interfacial em suportes hidrofóbicos foi estudada, bem como sua estabilização por técnicas de pós-imobilização. Assim, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de derivados com alta resistência a temperaturas, valores de pH e o uso de solventes orgânicos, aplicando-os a um processo de enriquecimento de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 a partir da hidrólise do óleo de peixe.

2. Metodologia

2.1 Construção de um modelo estrutural da lipase

A conformação estrutural da lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi estimada por modelagem comparativa. A sequência da lipase (NCBI access: NHH84158) foi utilizada para a construção de um modelo a partir da estrutura tridimensional da lipase de *B. cepacia* (PDB access: 1ys2.1.A) como molde (identidade de sequências = 82,7%). O modelo foi construído pelo método de modelagem de regiões conservadas de corpos rígidos através do servidor automatizado Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>). A anotação dos resíduos constituintes da tríade catalítica foi feita com base no exposto por Dalal e colaboradores (2008).

2.2 Produção da lipase

A lipase de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi obtida por fermentação em estado sólido em farelo de trigo conforme cultivo otimizado descrito no Capítulo III. As condições de cultivo foram as seguintes: temperatura 32,6 °C, umidade 65% obtida com tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8, óleo de soja 1% (m/m) e 1 mL de inóculo com OD₆₀₀ ajustada para 0,9 com tampão

fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ pH 5,8 (conforme item 2.3.1 , capítulo III). Após quatro dias de cultivo, o extrato foi obtido com as seguintes condições de extração: temperatura 16,2 °C, tampão fosfato de sódio 67,1 mmol.L⁻¹ pH 6,8, Triton X-100 0,7% (m/v) e goma arábica 0,1% (m/v) com agitação de 150 rpm por 1h.

As lipases comerciais de *Burkholdeira cepacia* (Amano) e *Thermomyces lanuginosa* (Novozymes) foram utilizadas para construção de derivados imobilizados como forma de comparação com a lipase de *B. gladioli* BRM58833.

2.3 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica dos derivados obtidos foi determinada conforme descrito no item 2.7.1 (método colorimétrico, hidrólise do pNPP) do capítulo I em uma cubeta termostaticada (caminho óptico = 1 cm) com agitação magnética constante (Espectrofotômetro Jasco V-630).

2.4 Purificação e imobilização em Sulfopropil Sepharose

Uma etapa de purificação por imobilização em sulfopropil sepharose (SP) foi realizada para remover o Triton X-100 do extrato enzimático bruto contendo a lipase. Primeiramente, o extrato foi dialisado durante a noite (*cut-off* 12 kDa) contra tampão acetato 10 mmol.L⁻¹ em pH 5,0 e, a seguir, diluído duas vezes no mesmo tampão. A solução resultante foi combinada com SP em uma proporção 1:10 suporte:solução. Esta suspensão foi incubada a 25 °C durante 3 h sob agitação suave. A fim de acompanhar o processo de imobilização, a suspensão e o sobrenadante foram avaliados periodicamente quanto à atividade da lipase. Finalmente, a preparação imobilizada foi filtrada a vácuo e cuidadosamente lavada com tampão acetato 10 mmol.L⁻¹ em pH 5,0 para remover as impurezas. A lipase foi desorvida de SP com NaCl 0,4 mol.L⁻¹ em tampão fosfato 25 mmol.L⁻¹ pH 8,5 e agitação moderada por 1 h. Em seguida, o sobrenadante obtido foi dialisado durante a noite (*cut-off* da membrana de 12 kDa) contra tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,0 para remoção dos sais e ajuste do pH. Esta solução de lipase resultante (denominada BGLip) era livre de Triton X-100 e poderia ser aplicada a outros métodos de imobilização.

2.5 Imobilização em glioxil agarose

A agarose 10BCL foi esterificada com glicidol e então oxidada com periodato de sódio para se obter agarose ativada com grupos glioxil (GLA) (Guisan, 1988). O suporte obtido foi utilizado para a imobilização de lipases de *B. gladioli* em sete condições diferentes: (1) incubação com BGLip pH 8,5 e adição de Triton X-100 e ditioneitol (DTT); (2) incubação com sobrenadante de SP a pH 8,5 e adição de DTT; (3) incubação com BGLip a pH 8,5; (4) incubação com BGLip a pH 8,5 e adição de DTT; (5) incubação com BGLip a pH 10,0 e adição de Triton X-100; (6) incubação com sobrenadante de SP a pH 10,0; e (7) incubação com BGLip a pH 10,0. Todos os testes foram realizados considerando 500 µg de proteína por g de suporte em tampão bicarbonato 10 mmol.L⁻¹ e GLA na proporção 1:10 suporte:solução. Quando presentes, foi considerada uma concentração final de Triton X-100 0,1% e DTT 50 mmol.L⁻¹. As suspensões foram incubadas a 25 °C durante 5 h sob agitação suave e foram avaliadas periodicamente quanto à atividade da lipase. Em seguida, borohidreto de sódio (1 mg.mL⁻¹) foi adicionado e a mistura foi incubada por 30 min a 25 °C sob agitação moderada a fim de reduzir as bases de Schiff formadas. Ao final, as preparações imobilizadas foram filtradas a vácuo e minuciosamente lavadas com tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,0 para remoção do borohidreto de sódio residual.

2.6 Imobilização em suportes hidrofóbicos

Para imobilizar a lipase de *B. gladioli* BRM58833, BGLip foi oferecida a diferentes suportes hidrofóbicos: Butil Sepharose (BUT), Octil Sepharose (OCT), Fenil Sepharose (PHE), Octodecil Sepabeads (C18), Metil-Estibeno (MES) e Lewatit 1600 (LEW). Cada suporte foi adicionado ao BGLip na proporção 1:10 suporte:solução e incubado a 25 °C em tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ a pH 7,0 sob agitação moderada por tombamento (Bastida et al., 1998). A presença da lipase foi monitorada tanto na suspensão quanto no sobrenadante, os quais foram medidos periodicamente pelo ensaio de atividade lipolítica. Ao final do processo, os derivados foram filtrados a vácuo e minuciosamente lavados com tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,0.

2.7 Parâmetros de imobilização

O rendimento da imobilização e as atividades expressas nos derivados foram usados como parâmetros para avaliar cada procedimento de imobilização e foram calculados conforme representado nas equações 1 e 2:

$$\text{Rendimento de imob. (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Atv. final sobrenadante (U/mL)}}{\text{Ativ. inicial (U/mL)}}\right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{Atv. Expressa (\%)} = \left(\frac{\text{Atv. suspensão (U/mL)} \cdot \text{Rendimento}}{\text{Atividade inicial (U/mL)}}\right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

2.8 Determinação de parâmetros cinéticos: Km e Vmáx

A influência da concentração de substrato nas velocidades de reação foi determinada com pNPP como substrato. A solução enzimática (enzima livre ou suspensão do derivado imobilizado) foi incubada com pNPP com concentrações variando de 0,02 a 1,26 mmol·L⁻¹. Os parâmetros cinéticos Vmax (velocidade máxima) e constante de Michaelis (Km) foram estimados a partir da equação de Michaelis-Menten sem linearização a fim de melhorar o ajuste, evitar aproximações e considerar incertezas experimentais. Um procedimento iterativo de estimativa de mínimos quadrados, baseado no algoritmo de Gauss-Newton, foi realizado para obter os parâmetros que melhor se ajustam ao modelo cinético e aos dados experimentais. O critério de convergência adotado foi de 10⁻⁶ com número máximo de iterações de 100.

2.9 Adsorção de polímeros hidrofílicos

Para melhorar a estabilidade dos derivados, dois polímeros policatiônicos foram adsorvidos à superfície da enzima: polietilenoimina (PEI, MW de 10, 25 ou 60 kDa) e polialilamina (PAA, MW 17,5 kDa). Um grama de lipase imobilizada em octil (OCT) foi combinado com 16 mL de uma solução de polímero a 25 mg·mL⁻¹ em tampão bicarbonato 10 mmol·L⁻¹ a pH 8,0 por 16 h sob agitação moderada a 4 °C (Trobo-Maseda et al., 2018). Em seguida, os

derivados foram filtrados a vácuo e minuciosamente lavados com tampão fosfato 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,0.

2.10 Entrecruzamento com dextrano-aldeído

O dextrano-aldeído (DEXa) foi obtido pela oxidação do dextrano (MW 25 kDa) em uma solução de periodato de sódio conforme descrito por Fernández-Lafuente e colaboradores (1999). A lipase imobilizada em OCT foi adicionada ao dextrano-aldeído em tampão bicarbonato 10 mmol.L⁻¹ a pH 8,5 em uma proporção 1:10 suporte:solução e incubada a 25 °C por 16 h e sob agitação moderada. Posteriormente, foi adicionado borohidreto de sódio (1 mg.mL⁻¹) e a mistura foi incubada durante 30 min a 25 °C sob agitação suave. Ao final, as preparações imobilizadas foram filtradas a vácuo e minuciosamente lavadas com tampão fosfato de sódio 10 mmol.L⁻¹ em pH 7,0 para remoção do borohidreto de sódio residual (Orrego et al., 2018). Diferentes concentrações de DEXa (10 ou 50 mg.g⁻¹ de suporte) foram avaliadas ao longo do tempo para determinar a estratégia que mais promoveria um aumento na estabilização.

Da mesma forma, uma estratégia combinada foi usada para avaliar o efeito de estabilização de DEXa como uma segunda camada de revestimento. Portanto, usando as condições descritas acima, derivados de OCT-PEI e OCT-PAA foram combinados com DEXa.

2.11 Construção de uma bicamada polimérica de DEXa e NH₂-PEG

Os derivados contendo uma primeira camada de DEXa (antes da etapa de redução) foram ainda modificados com metoxipolietilenoglicol amina (NH₂-PEG). Para isso, os derivados OCT-DEXa foram incubados com NH₂-PEG (MW de 2 ou 10 kDa) em diferentes concentrações (25 ou 250 mg.g⁻¹ de suporte) em tampão bicarbonato 10 mmol.L⁻¹ em pH 8,5 em uma proporção 1:10 suporte:solução e incubados a 25 °C por 16 h e sob agitação moderada. Além disso, a combinação de NH₂-PEG e glicina (GLY) foi avaliada para a obtenção de polímeros bifuncionais. Neste caso, a incubação com NH₂-PEG foi seguida por uma segunda incubação com GLY sempre a 250 mg.g⁻¹ de suporte em tampão de bicarbonato 10 mmol.L⁻¹ em pH 8,5. Uma estratégia invertida de incubação (GLY seguido por NH₂-PEG) também foi estudada. Para todos os

casos, após revestimento com polímeros, foi adicionado borohidreto de sódio (1 mg.mL^{-1}) e a mistura foi incubada durante 30 min a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação suave. Ao final, as preparações imobilizadas foram filtradas a vácuo e minuciosamente lavadas com tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} em pH 7,0 para remoção do borohidreto de sódio residual.

2.12 Análise de estabilidade

Para comparar os efeitos de cada estratégia de estabilização, todos os derivados foram submetidos a uma temperatura de $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em tampão fosfato 10 mmol.L^{-1} em pH 7,0 e as atividades residuais foram medidas periodicamente ao longo do tempo. Aqueles que apresentaram maior estabilidade térmica foram selecionados para avaliação da estabilidade em condições alcalinas, sendo incubados a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em tampão bicarbonato 10 mmol.L^{-1} em pH 10. Da mesma forma, as atividades residuais foram medidas periodicamente para acompanhar a inativação de cada derivado. A meia-vida de cada derivado foi estimada considerando as atividades residuais (A) em função do tempo conforme representado na Equação 3, onde kd corresponde às constantes da taxa de inativação e t corresponde ao tempo.

$$A = A_0 \cdot e^{-kd.t} \text{ (Eq. 3)}$$

Por fim, um índice de estabilização foi calculado dividindo a meia-vida de cada derivado pela meia-vida do derivado controle para classificá-los de acordo com sua estabilidade.

2.13 Hidrólise do óleo de peixe

A hidrólise de óleo de peixe foi realizada em um sistema bifásico de acordo com procedimento descrito por Fernández-Lorente e colaboradores (2011) com modificações. Após combinar 5 mL de *n*-heptano com 5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mmol.L^{-1} em pH 7,0 e 0,1 mL de óleo de peixe (NuaDHA 500), o sistema foi deixado sob agitação vigorosa por 30 min a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A reação foi iniciada adicionando 300 mg de derivado imobilizado. O sistema foi deixado a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante. Para coletar alíquotas, o sistema foi retirado da agitação e foram coletados 100 μL da fase orgânica para análise

periódica da composição de DHA. A produção de DHA foi avaliada por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC (Spectra Physic SP 100 acoplado a um detector de UV Spectra Physic SP 8450). Os ácidos graxos foram separados utilizando uma coluna Kromasil C8 (15 x 0,4 cm) e eluição isocrática com fluxo de 1 mL.min⁻¹ em acetonitrila:tampão Tris 10 mmol.L⁻¹ pH 3 (70:30 v/v). Para a detecção, utilizou-se um comprimento de onda de 215 nm. A quantificação de DHA decorrente das reações de hidrólise foi feita comparando a área dos picos correspondentes com a obtida para o padrão comercial puro. O tempo de retenção para o DHA foi de 14,32 min.

3. Resultados e Discussão

3.1 Imobilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833

Para que uma enzima seja implementada com sucesso em um processo industrial, ela deve possuir não apenas uma alta atividade em relação ao seu substrato, mas também é necessário que seja estável. Dessa forma, a lipase obtida do cultivo de *B. gladioli* BRM58833 em farelo de trigo foi submetida à imobilização em diferentes suportes. Inicialmente, o extrato enzimático bruto foi ionicamente imobilizado em sulfopropil sepharose (Tabela 1, derivado # 1) para separar o Triton X-100 e outras impurezas das enzimas. Embora essa etapa tenha apresentado um rendimento de apenas 10,5%, foi necessária para adsorver parte da atividade da lipase ao suporte, permitindo a obtenção de uma solução de lipase livre de Triton X-100 após a dessorção. Após esse processo, duas soluções de lipase foram obtidas: BGLip (uma solução livre de Triton X-100) e SP-S (que representou a fração de lipase do extrato enzimático bruto que não pôde ser adsorvida em SP durante o processo de imobilização). Ambas as soluções de lipase foram então aplicadas a processos de imobilização subsequentes para obtenção de diferentes derivados.

Tabela VI.1. Imobilização e estabilidade térmica das lipases de *B. gladioli* BRM58833 e *B. cepacia* em diferentes suportes. Condição controle: GLA-1.

#	Derivado	Fração utilizada	pH de imobilização	Rendimento de imobilização (%)	Atividade expressa (%)	t _{1/2} (h)	Índice de estabilização térmica
<i>B. gladioli</i> BRM58833 Lipase							
1	SP	Extrato bruto	5,0	10,5	11,9	0,7	2,8
2	GLA-1	BGLip ^{a, b}	8,5	60,4	37,1	0,2	1,0
3	GLA-2	SP-S ^b	8,5	77,0	39,9	0,8	3,5
4	GLA-3	BGLip	8,5	43,0	77,7	3,0	12,4
5	GLA-4	BGLip ^b	8,5	25,2	33,3	1,9	7,9
6	GLA-5	BGLip ^a	10,0	93,9	66,5	0,2	0,9
7	GLA-6	SP-S	10,0	80,8	78,2	0,3	1,4
8	GLA-7	BGLip	10,0	93,4	58,2	1,2	4,9
9	BUT	BGLip	7,0	100,0	99,2	0,8	3,3
10	OCT	BGLip	7,0	100,0	136,8	3,9	16,3
11	PHE	BGLip	7,0	100,0	107,5	0,6	2,6
12	C18	BGLip	7,0	83,2	27,5	0,1	0,6
13	MES	BGLip	7,0	90,2	30,3	0,2	1,0
14	LEW	BGLip	7,0	95,0	35,5	0,3	1,1
<i>B. cepacia</i> (Amano) Lipase							
15	GLA-cepacia	Comercial	8,5	70,8	47,1	2,9	12,3 / 1,0*
16	OCT-cepacia	Comercial	7,0	100,0	114,1	14,7	62,1 / 4,8*

^a Adição de Triton X-100 0,1%; ^b Adição de DTT 50 mmol.L⁻¹;

* Índice de estabilidade calculado considerando GLA-cepacia como controle.

Em seguida, BGLip e SP-S foram covalentemente imobilizados em agarose ativada com grupos glioxil produzindo GLA-1 e GLA-2 (Tabela 1, derivados # 2 e # 3, respectivamente). A imobilização de proteínas em agarose ativada com grupos glioxil é um método de imobilização por ligação covalente. Neste tipo de estratégia, os aldeídos presentes na superfície do suporte tendem a formar bases de Schiff muito instáveis com os grupos amino dispostos na superfície da proteína (Figura VI.1). Segundo López-Gallego e colaboradores (2013), em condições de pH pouco alcalinas a porção N-terminal da proteína (pK ~ 7,5) é muito mais reativa do que os grupos amino presentes

nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácido na superfície da proteína (pK Lys ~10,5). Assim, em condições de pH 8,5 como utilizado para BGLip e SP-S, é favorecida a ligação da lipase ao suporte por meio de uma ligação unipontual.

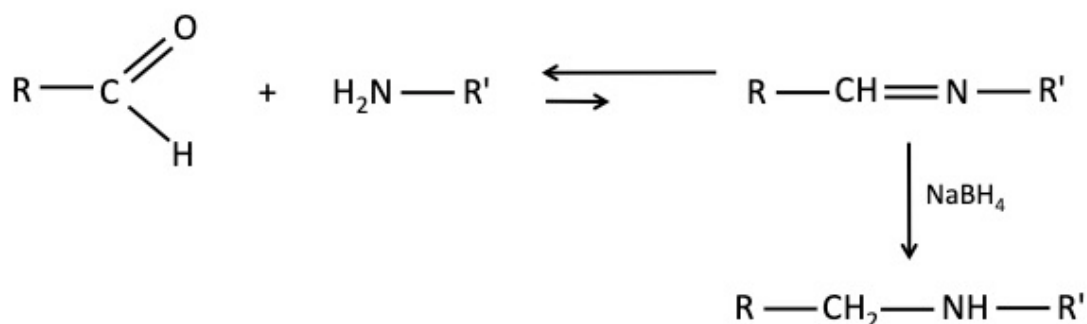


Figura VI.1. Imobilização em agarose ativada com grupos glioxil. As bases de Schiff formadas entre as porções amino da proteína e os grupos aldeído do suporte é convertida em uma ligação covalente por meio da redução com borohidreto de sódio.

Uma vez que o modelo estrutural da lipase de *B. gladioli* BRM58833 demonstrou a localização da porção N-terminal na superfície da enzima e em extremidade oposta à cavidade do sítio ativo, é inferida a formação de uma ligação da enzima ao suporte por meio de um posicionamento estérico favorável, expondo a cavidade do sítio ativo ao meio reacional (Figura VI.2). Às preparações GLA-1 e 2, adicionou-se DTT e Triton X-100 e apenas DTT, respectivamente. De acordo com Ortiz e colaboradores (2019), as lipases podem ser adsorvidas a qualquer superfície hidrofóbica, fazendo com que haja uma tendência de formar agregados diméricos resultantes da interação entre duas formas abertas. Assim, o uso de surfactantes durante o processo de imobilização é responsável por desfazer estes agregados, favorecendo a imobilização das enzimas em sua forma monomérica. A adição de DTT, por outro lado, proporciona uma estabilização das bases de Schiff formadas, preservando a interação enzima-suporte até o momento de redução e formação de uma ligação covalente (Bolívar et al., 2009). Este efeito é especialmente desejado em situações de pH pouco alcalino, em que é favorecida a formação de uma ligação unipontual, como no caso apresentado.

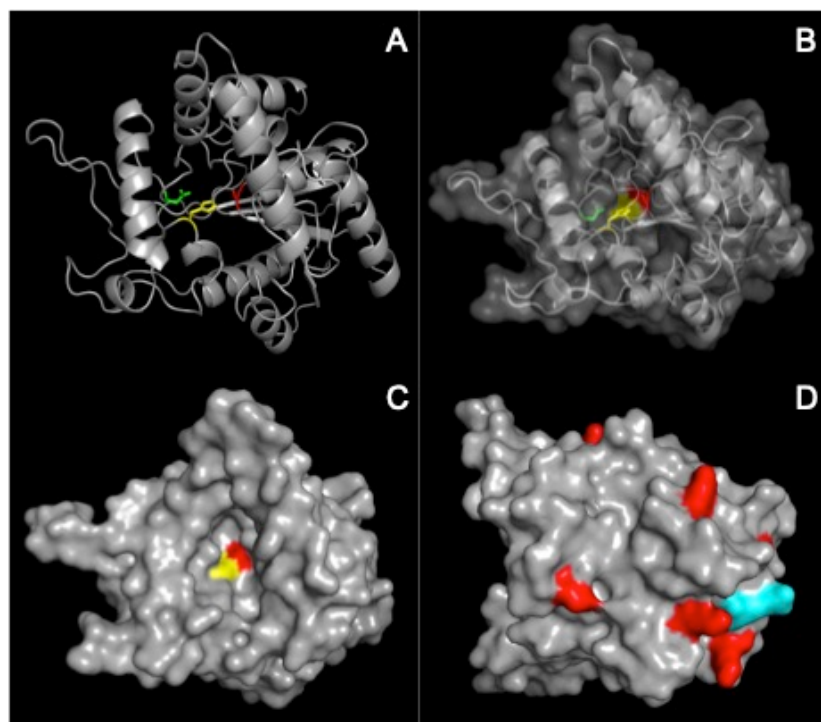


Figura VI.2. Modelo estrutural da lipase de *B. gladioli* BRM58833. (A) Modelo cartoon com sítio ativo em destaque (vermelho: S-126; verde: D-302; amarelo: H-324); (B) Modelo cartoon com sobreposição da superfície; (C) Cavidade do sítio ativo; (D) Superfície oposta à cavidade do sítio ativo com destaque para os resíduos de Lys (vermelho) e a porção N-terminal (azul); Modelo obtido utilizando o template 1ys2.1.A da lipase de *B. cepacia* disponível no PDB.

O derivado GLA-1 representou a variação mais semelhante com a enzima livre monomérica (sem formação de agregados e com a enzima fixada ao suporte por meio de uma ligação covalente unipontual sem impedimento estérico do sítio ativo). Mais ainda, quando fixada covalentemente por uma única ligação ao suporte, a lipase se comporta como em solução, alternando entre sua conformação fechada e inativa (maior percentual), com sua conformação aberta e ativa (menor percentual). Além disso, em pH 7,0 a estabilidade térmica de GLA-1 foi semelhante à estabilidade obtida para a enzima solúvel e diluída. Portanto, GLA-1 foi escolhido como referência para comparação com todos os derivados obtidos.

De forma similar a GLA-1, para a construção do derivado GLA-3 (Tabela 1, derivado # 4), BGLip foi covalentemente imobilizado em agarose ativada com grupos glioxil, mas na ausência de Triton X-100 e DTT. Isso significou que se um agregado estivesse presente e suas lipases estivessem dispostas em

uma coordenação que favorecesse a exposição de seus N-terminais em um mesmo plano de forma que ambos pudessem interagir com os grupos aldeídos do suporte, então o complexo seria mais estável e se fixaria melhor ao suporte. Se não houvesse presença de agregados, a enzima livre estaria em equilíbrio de ligação-separação, assim como GLA-1 antes da etapa de redução. Para GLA-4 (Tabela 1, derivado # 5) as mesmas condições que GLA-3 foram consideradas, mas DTT foi adicionado para avaliar a influência deste agente tiolado.

A diferença de rendimentos de imobilização entre os derivados GLA-3 e 4 evidencia que o DTT não cumpriu seu papel estabilizador das bases de Schiff como esperado. Bolívar e colaboradores (2009) demonstraram que na presença de DTT, ou outros compostos tiolados, as iminas formadas entre os grupos aldeído do suporte e as porções reativas da enzima são transientemente reduzidas, estabilizando a manutenção da base de Schiff. Este mesmo efeito não foi observado para a lipase de *B. gladioli* BRM58833. Já o menor rendimento de imobilização nas condições sem Triton X-100, confirma que a lipase em sua forma monomérica resulta em interações mais estáveis com o suporte, enquanto que a conformação resultante do agregado dimérico das lipases não apresenta uma posição ideal que possibilite maior estabilização do complexo.

Para a construção dos derivados GLA-5, GLA-6 e GLA-7 (Tabela 1, derivados # 6, # 7 e # 8, respectivamente) foi considerado um pH de 10,0 para imobilização. Nessa condição alcalina, os resíduos de lisina da superfície enzimática se apresentam carregados e, portanto, reativos. Isso significa que a formação das bases de Schiff deveu-se não apenas à porção N-terminal, mas também a regiões ricas em lisina que poderiam ser expostas na superfície da enzima, proporcionando uma fixação covalente multipontual. A Figura VI.2 destaca uma região rica em resíduos de Lys na superfície enzimática próxima à porção N-terminal. Desta forma, presume-se uma imobilização com orientação similar à obtida para GLA-1 (cavidade do sítio catalítico exposta ao meio reacional). A formação de uma ligação multipontual ao suporte promove, entretanto, o desenvolvimento de uma estrutura mais enrijecida, que pode

favorecer a estabilidade dos derivados mas não necessariamente sua atividade catalítica.

GLA-5 e GLA-7 foram obtidos da imobilização de BGLip e GLA-6 foi referente à imobilização de SP-S, sendo a diferença entre GLA-7 e GLA-5 a ausência do Triton X-100 em GLA-7, o que também permitiu a fixação dos agregados. Observou-se que as condições de imobilização multipontual ao suporte resultaram em maiores rendimentos como esperado, pois o aumento da quantidade de bases de Schiff estabilizariam melhor o derivado previamente à etapa de redução.

BGLip também foi usado para imobilizar a lipase de *B. gladioli* BRM58833 em suportes hidrofóbicos por adsorção interfacial, produzindo derivados BUT, OCT, PHE, C18, MES e LEW (Tabela 1, derivados # 9 a # 14, respectivamente). Nesta abordagem, as lipases são imobilizadas por afinidade com suas formas abertas adsorvidas ao suporte hidrofóbico. Este processo é responsável não só pela estabilização de suas estruturas, mas também por favorecer a proteção dos sítios ativos, uma vez que se tornam menos acessíveis aos agentes de modificação físico-química que possam ser aplicados (Bastida et al., 1998). Conforme esperado, o uso de suportes hidrofóbicos alcançou maiores rendimentos de imobilização quando comparados aos derivados GLA. A octil sepharose foi o melhor suporte para a imobilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833 com não só um rendimento de 100%, mas também uma atividade expressa de 136,8%, indicando um perfil de hiperativação (Figura VI.3). A hiperativação de lipases quando adsorvidas a suportes hidrofóbicos é um fenômeno amplamente discutido na literatura e é um dos motivos pelos quais esses suportes têm sido muito utilizados para imobilizar lipases de diferentes fontes.

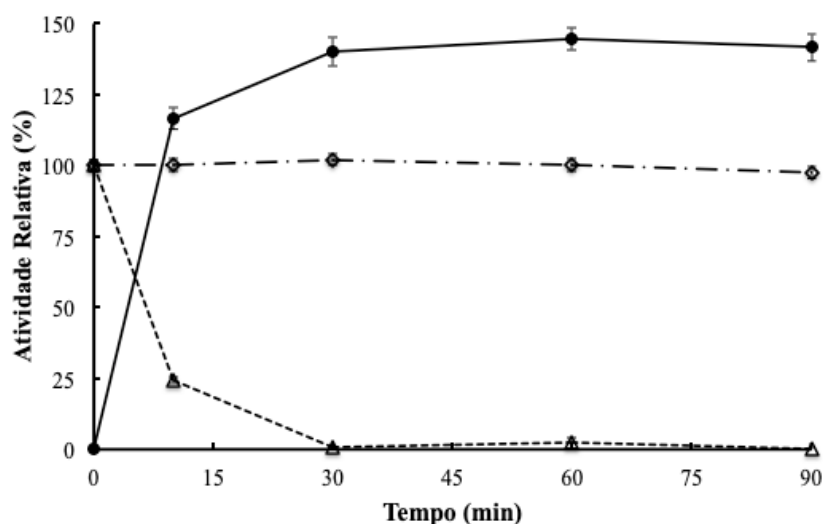


Figura VI.3. Imobilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833 em octil sepharose. Solução de enzima livre sem suporte (círculos abertos, linha hachurada); Suspensão de imobilização (círculos, linha preta sólida); e Sobrenadante de imobilização (triângulos, linha pontilhada).

O perfil de hiperativação da lipase por meio da imobilização por ativação interfacial em octil sepharose também pode ser comprovado pela alteração dos parâmetros cinéticos da enzima. O V_{max} aparente foi determinado em $2,4 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para BGLip (enzima livre oferecida à octil sepharose) e $2,1 \cdot 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a enzima imobilizada em octil sepharose. Já os valores aparentes de K_m obtidos foram de $3,28 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ e $1,59 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ para BGLip e para o derivado OCT com coeficientes de determinação (R^2) de 0,99 e 0,97, respectivamente. A diminuição expressiva no valor de K_m reflete um aumento de mais de duas vezes da afinidade da lipase imobilizada pelo substrato em relação à sua forma livre.

Como discutido por Rodrigues e colaboradores (2019), a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é consequência do processo de ativação interfacial promovido pela superfície hidrofóbica dos suportes. Um critério necessário a este tipo de estratégia é o uso de uma força iônica muito baixa, sendo que em condições de alta força iônica, a conformação aberta da lipase é desfavorecida, e como esta é a única forma da enzima ser adsorvida via ativação interfacial, a imobilização da lipase ocorre de forma mais lenta e menos específica. Mais ainda, o trabalho original responsável pelo desenvolvimento da técnica descreve o método como uma forma de

purificação, imobilização e hiperativação de lipases em um único passo (Bastida et al., 1998). Desta forma, pode-se dizer que esta metodologia não segue um processo de adsorção hidrofóbica convencional, podendo ser caracterizado como uma imobilização por “pseudoafinidade”.

Algumas das vantagens do método incluem a simplicidade de execução, o baixo custo, a rapidez de obtenção de derivados e a possibilidade de ser realizado em qualquer condição de pH, sem a necessidade de expor a enzima a condições que possam repercutir negativamente em seu funcionamento. Além disso, embora o centro ativo da enzima seja posicionado em direção à superfície do suporte, o bolsão da enzima formado pelo contato com o suporte permite a entrada de grandes substratos, possibilitando que atividades elevadas sejam alcançadas e, em alguns casos, até mais elevadas do que aquelas obtidas para a lipase livre (Rodrigues et al., 2019). Outrossim, foi demonstrado que derivados imobilizados por adsorção das lipases em sua conformação aberta são muito estáveis, podendo alcançar estabilidades maiores até do que a de derivados obtidos por ligações covalentes multipontuais (Palomo et al., 2002). De fato, o derivado OCT apresentou um índice de estabilização térmica 16,3 vezes maior que a condição controle e 3,25 vezes maior se comparado à condição de imobilização por ligação covalente multipuntual mais estável.

3.2 Estabilização dos derivados com técnicas de pós-imobilização

Estabilizar uma enzima é um dos principais desafios da engenharia enzimática e pode ser alcançado por diversas técnicas de imobilização e pós-imobilização. Para as lipases, a imobilização em suportes hidrofóbicos via adsorção interfacial tem sido amplamente utilizada. Apesar da imobilização de lipases por ativação interfacial em suportes hidrofóbicos apresentar uma série de vantagens, a grande limitação da técnica está relacionada à possibilidade de dessorção da enzima em condições de alta temperatura, presença de solventes orgânicos e concentrações moderadas de surfactantes. Outrossim, quando imobilizadas por este método, apenas uma pequena parte da superfície enzimática permanece em contato com o suporte, permitindo a aplicação de outras

estratégias de estabilização combinadas (técnicas de pós-imobilização), como o revestimento de derivados imobilizados com polímeros (Romero-Fernández et al., 2018), visando estabelecer mais interações enzima-suporte e, assim, proporcionar maior estabilidade aos derivados imobilizados.

Dentre as estratégias de modificação pós-imobilização, destaca-se o uso de polímeros para o revestimento da superfície enzimática por meio de interações iônicas ou de ligações covalentes (Romero-Fernández et al., 2018). Nessa perspectiva, Guisán e colaboradores (2001) propuseram o primeiro trabalho envolvendo o revestimento de lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos com polietilenimina (PEI). A PEI é um polímero policatiônico que apresenta em sua estrutura uma grande quantidade de aminas primárias (25%), secundárias (50%) e terciárias (25%), funcionando como um forte trocador aniônico (Vírgen-Ortiz et al., 2017). Outro polímero policatiônico com propriedades interessantes é a polialilamina (PAA), que apresenta uma densidade de cargas um pouco menor que a PEI, mas de igual aplicabilidade. Assim, para ambos os polímeros, as lipases imobilizadas são incubadas na presença de polímero em baixa força iônica e em um valor de pH superior ao ponto isoelétrico da enzima. Desta forma, a superfície das lipases é revestida com uma camada protetiva por meio de uma intensa reticulação entre diferentes unidades da enzima e a cadeia do polímero, estando a cavidade do sítio ativo protegida de qualquer modificação devido à sua orientação em direção à superfície do suporte no momento da imobilização. Outra vantagem conferida pelo processo é que a camada polimérica formada tem uma característica muito hidrofílica, funcionando como uma barreira protetiva aos danos de solventes e surfactantes (Figura VI.4). Da mesma forma, o revestimento polimérico acaba por promover uma redução da mobilidade das enzimas, além de formar nanoambientes que conferem maior estabilidade à lipase. Segundo Rodrigues e colaboradores (2019), a reticulação de várias moléculas de lipase com o polímero promove que o agregado resultante se torne imobilizado por vários locais, requerendo a dessorção simultânea de vários pontos para a liberação do agregado. Desta forma a perda de enzima para o meio reacional é reduzida, permitindo uma durabilidade do derivado ao longo de mais ciclos de reação. Este conceito foi demonstrado por Peirce e

colaboradores (2016), onde a incubação de imobilizados de CALB sobre octil em Triton X-100 apresentou uma perda enzimática drasticamente reduzida após o revestimento com PEI.

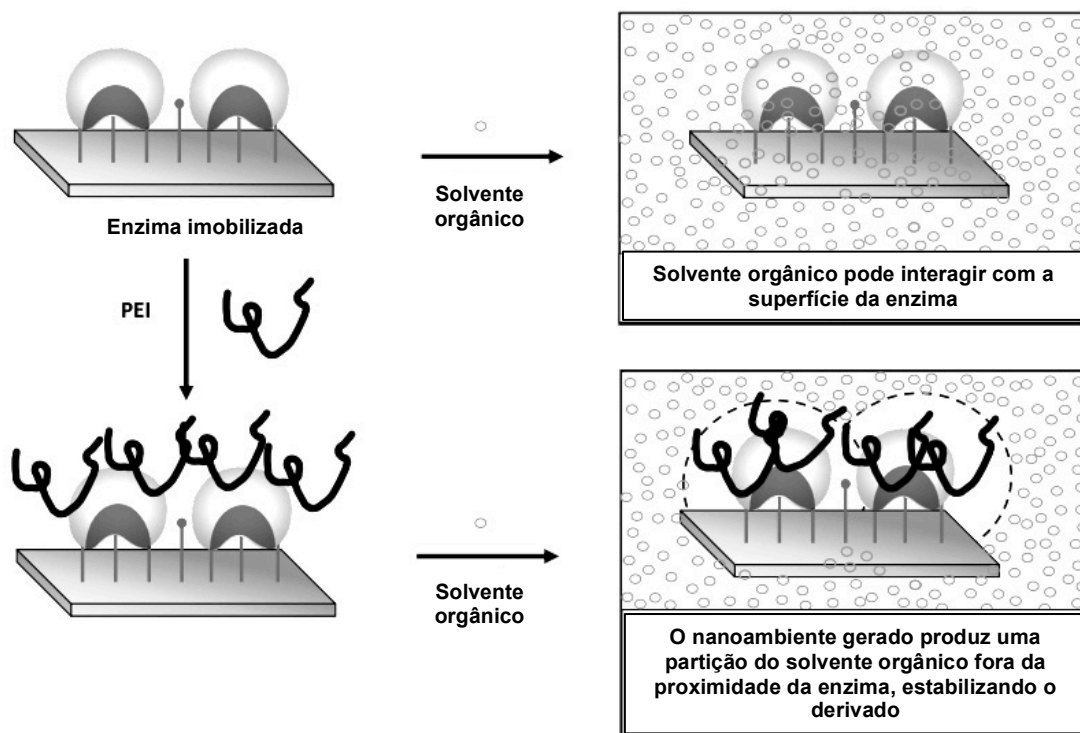


Figura VI.4. Estabilização da enzima por revestimento com polietilenimina. Adaptado de Virgen-Ortiz et al. (2017).

Uma vez que a imobilização de lipases de *B. gladioli* BRM58833 em octil sepharose foi o melhor método para obter altos rendimentos e atividades, o derivado OCT foi escolhido como a base para o desenvolvimento de novos derivados por meio de outras estratégias de estabilização. Deste modo, OCT foi revestido com uma camada de PEI 25 kDa ou PAA 17,5 kDa (Tabela VI.2, derivados # 18 e # 22, respectivamente). O revestimento com PEI resultou em um aumento de 77,7 vezes na termoestabilidade quando comparado ao controle e foi 3,8 vezes mais estável do que o derivado análogo com revestimento de PAA. Assim, tamanhos diferentes de PEI, 10 e 60 kDa, foram avaliados para produzir mais derivados (Tabela VI.2, derivados # 17 e # 19,

respectivamente). Como observado por Romero-Fernández e colaboradores (2018), massas moleculares ou graus de revestimentos mais elevados não significam necessariamente maiores estabilidades. Diferentes massas moleculares terão diferentes efeitos sobre o microambiente gerado e sobre as mudanças estruturais, resultando em diferentes extensões de estabilização. Assim, após avaliação da estabilidade dos derivados construídos, observou-se que o derivado OCT-PEI (25 kDa) foi o mais estável entre seus análogos de 10 e 60 kDa.

Outra abordagem para o revestimento com polímeros consistiu do uso do dextrano-aldeído (DEXa). Diferentemente do recobrimento por interações iônicas observado para o uso de PEI e PAA, o revestimento com DEXa é feito por meio da formação de ligações covalentes, impossibilitando a reversibilidade do processo e a regeneração dos suportes após seu uso. As interações ocorrem por meio dos grupos aldeído presentes no DEXa, tendo preferência pela formação de ligações de dois pontos com grupos amino vizinhos expostos tanto em porções descobertas da superfície da enzima ou de alta densidade de grupos amino nos polímeros policatiônicos utilizados como primeira camada de revestimento. Assim, a adição de DEXa é capaz de formar pequenas intersecções responsáveis por reduzir o mobilidade da enzima imobilizada e, deste modo, possibilitar um aumento na estabilidade do conjugado desenvolvido (Orrego et al., 2018).

A combinação de estratégias de estabilização com a construção de camadas de polímeros policatiônicos e DEXa produz um polímero viscoso com efeitos estabilizadores interessantes sobre as lipases imobilizadas. Esperava-se especialmente que o derivado recoberto de PAA melhse sua estabilidade com a adição de uma segunda camada de DEXa, pois a PAA contém dois grupos amino muito próximos capazes de reagir com os aldeídos do DEXa. O aumento na estabilidade para o derivado OCT-PAA-DEXa (Tabela VI.2, derivado # 23) foi 5,4 vezes maior do que sua contraparte de apenas uma camada. No entanto, embora o aumento observado para o derivado #23 tenha sido maior do que o aumento de 3,4 vezes alcançado para o derivado OCT-PEI-DEXa (Tabela VI.2, derivado # 20), quando comparado cada um com sua

contraparte de uma camada, o derivado # 20 foi aquele que obteve o maior índice de estabilização, sendo 263,8 vezes mais estável que o controle.

Tabela VI.2. Estabilização térmica das lipases de *B. gladioli* BRM58833 e *B. cepacia* imobilizadas em octil sepharose com revestimento de polímeros policatiônicos e dextrano-aldeído.

#	Suporte	Revestimento com polímeros		t _{1/2} (h)	Índice de estabilização térmica
		Primeira camada	Segunda camada		
<i>B. gladioli</i> BRM58833 Lipase					
17	OCT	PEI 10 kDa	-	11,6	49,1
18	OCT	PEI 25 kDa	-	18,4	77,7
19	OCT	PEI 60 kDa	-	8,0	34,0
20	OCT	PEI 25 kDa	DEXa	62,5	263,8
21	OCT	PEI 25 kDa	DEXa (oxidado)	53,5	226,1
22	OCT	PAA 17,5 kDa	-	4,8	20,2
23	OCT	PAA 17,5 kDa	DEXa	25,9	109,5
24	OCT	PAA 17,5 kDa	DEXa (oxidado)	46,7	197,2
<i>B. cepacia</i> (Amano) Lipase					
25	OCT-cepacia	PEI 25 kDa	-	42,5	179,4 / 12.3*
26	OCT-cepacia	PEI 25 kDa	DEXa	74,8	315,8 / 24.2*
27	OCT-cepacia	PAA 17,5 kDa	-	25,6	108,0 / 7.2*
28	OCT-cepacia	PAA 17,5 kDa	DEXa	84,9	358,7 / 27.8*

* Índice de estabilidade calculado considerando GLA-cepacia como controle

Quando não utilizado em seguida do seu preparo, os grupos aldeídos do DEXa tendem a reagir entre si, produzindo um polímero diferente. Este polímero DEXa envelhecido (oxidado) também é capaz de reagir com grupos amino presentes na superfície da enzima e com PEI/PAA, mas de uma forma que as ligações de um ponto também são favorecidas. Portanto, a mesma combinação usada para produzir os derivados # 20 e # 23 foi aplicada à construção de derivados com DEXa envelhecido (Tabela VI.2, derivados # 21 e # 24). A combinação do derivado coberto por PAA com DEXa envelhecido produziu um derivado 1,8 vezes mais estável do que sua contraparte feita com

DEXa recém preparado. Para o derivado coberto com PEI na primeira camada, no entanto, a preparação com DEXa fresco resultou em um derivado mais estável do que com o uso de DEXa envelhecido.

Outra estratégia na construção de derivados estáveis de lipases de *B. gladioli* BRM58833 foi o uso de DEXa como primeira camada. Assim, OCT foi revestido com 10 mg.g⁻¹ ou 50 mg.g⁻¹ de DEXa (Tabela VI.3, derivados # 29 e # 30, respectivamente). Assim como discutido anteriormente, graus de revestimento mais elevados não significam necessariamente maior estabilidade. De fato, os tratamentos com diferentes concentrações de DEXa resultaram em melhorias de 2,6 vezes no índice de estabilização para o derivado obtido com o uso de menos DEXa.

Alternativamente, outra estratégia foi utilizada para tentar melhorar a estabilidade da lipase. Assim, a enzima imobilizada em OCT foi primeiramente revestida com DEXa e, antes da etapa de redução para consolidação das ligações covalentes, foi oferecido metoxipolietilenoglicol amina (NH₂-PEG) à preparação. O NH₂-PEG é um composto de caráter mais hidrofóbico capaz de reagir com os grupos aldeídos remanescentes da incubação inicial de OCT em DEXa. Desta forma, uma segunda camada protetiva é adicionada ao derivado, podendo auxiliar na redução dos efeitos adversos de altas temperaturas e outros compostos presentes no meio reacional (Moreno-Pérez et al., 2016). Assim, NH₂-PEG (2 kDa) foi adicionado a uma concentração de 25 mg.g⁻¹ ou 250 mg.g⁻¹ à camada de DEXa do derivado # 29, resultando nos derivados # 31 e # 32, respectivamente (Tabela VI.3). A adição de NH₂-PEG de fato induziu a formação de derivados mais estáveis, com um aumento de 1,5 vezes na estabilidade do derivado apenas revestido com DEXa.

Ocasionalmente, o uso de agentes redutores muito agressivos, como o borohidreto de sódio, pode ser prejudicial para a estrutura da enzima, levando à perda da capacidade catalítica. Assim, agentes redutores menos agressivos podem ser aplicados, como 2-picolino borano. Por isso, foi avaliada a utilização deste agente redutor em vez de borohidreto de sódio. Uma vez que a redução com este agente redutor leva mais tempo, esta etapa da reação foi prolongada por 16 h. Dessa forma, o derivado # 34 foi produzido com 2-picolino borano

como agente redutor e o derivado # 33 com o método padrão usando borohidreto de sódio após serem expostos por 16 h a NH₂-PEG. Após o tratamento com 2-picolino borano foi observado um aumento de 7,9% na meia vida do derivado. Entretanto, apesar da prolongada exposição ao borohidreto de sódio, ainda considerou-se este método como mais interessante, já que envolvia uma metodologia mais simples e com menor tempo de preparo.

Tabela VI.3. Estabilização térmica da lipase de *B. gladioli* BRM58833 imobilizada em octil sepharose com dextrano-aldeído e polímeros bifuncionais.

#	Suporte	Revestimento com polímeros		t _{1/2} (h)	Índice de estabilização térmica
		Primeira camada	Segunda camada		
<i>B. gladioli</i> BRM58833 Lipase					
29	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	-	18,3	77,2
30	OCT	DEXa 50 mg.g ⁻¹	-	6,9	29,1
31	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{2 kDa} 25 mg.g ⁻¹	26,7	112,9
32	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{2 kDa} 250 mg.g ⁻¹	27,9	117,7
33	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{2 kDa} 250 mg.g ⁻¹ (overnight)	31,5	133,1
34	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{2 kDa} 250 mg.g ⁻¹ (overnight) + 2-picolino	34,0	143,8
35	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{10 kDa} 250 mg.g ⁻¹	47,6	201,2
36	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG ₁₀ /Gly	38,2	161,2
37	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	Gly/PEG ₁₀	28,5	120,4

Quando adicionado aos derivados, o NH₂-PEG é capaz de aumentar a viscosidade e a estabilidade ao custo de também aumentar a hidrofobicidade e a chance de expor bolsões hidrofóbicos da enzima, o que poderia, por sua vez, reduzir sua atividade. Entretanto, a construção de uma segunda camada com NH₂-PEG resultou em um derivado mais estável do que o revestimento apenas com DEXa. Ainda assim, para avaliar se a construção de uma segunda camada formada por um polímero bifuncional (com características hidrofílicas e hidrofóbicas) seria vantajosa, estudou-se a adição de glicina à camada de NH₂-PEG (Figura VI.5).

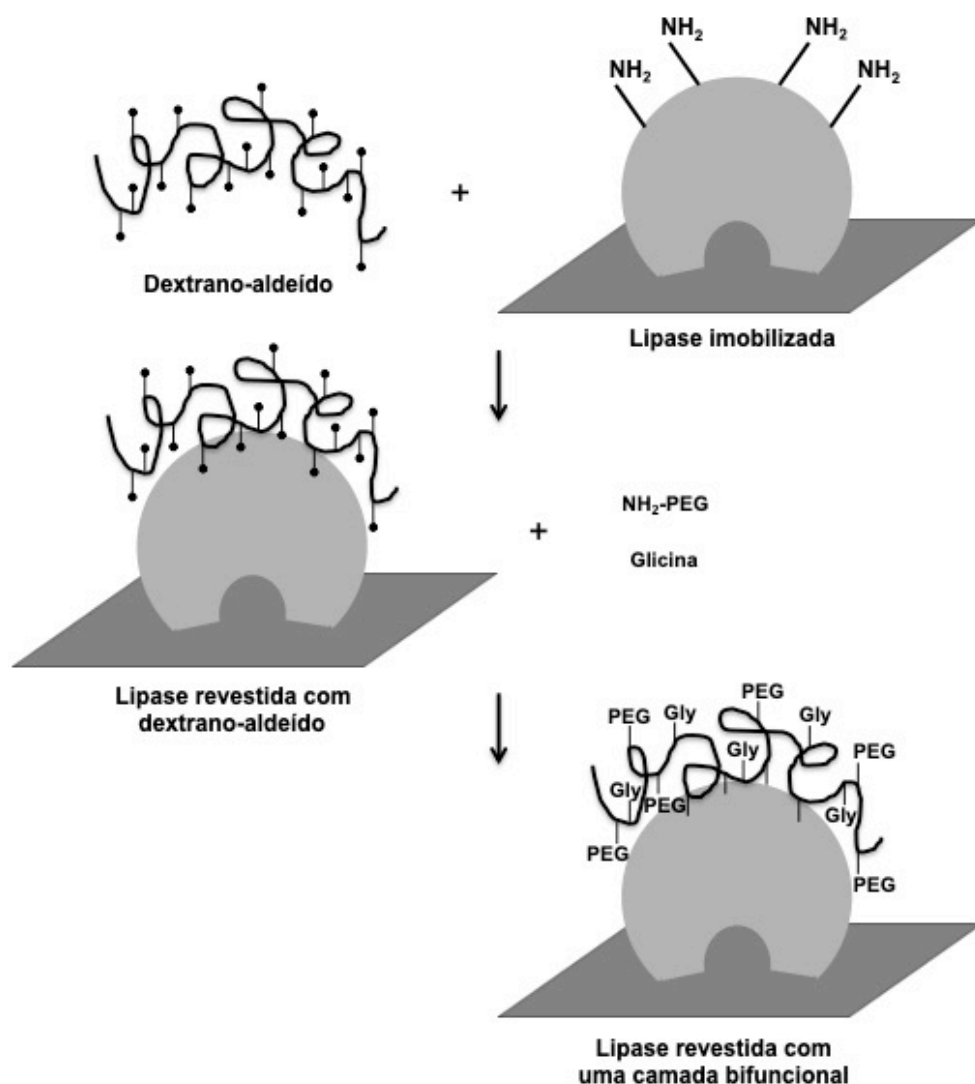


Figura VI.5. Dextrano-aldeído como base para a construção de uma camada bifuncional de metoxipolietilenoglicol amina e glicina em torno do superfície da enzima.

Neste sentido, o derivado #29 foi primeiramente oferecido a $\text{NH}_2\text{-PEG}$ e depois à glicina para obter o derivado #36. Alternativamente, o derivado #37 foi obtido invertendo a ordem de incubação, adicionando a glicina primeiramente. Ao contrário do esperado, a construção de uma segunda camada com polímeros bifuncionais não resultou em derivados mais estáveis do que quando utilizado apenas o $\text{NH}_2\text{-PEG}$ de 10 kDa.

Em seguida, os derivados que se destacaram por sua estabilidade térmica foram selecionados para avaliação da estabilidade em condições

alcalinas, sendo incubados a pH 10 (Tabela VI.4). De forma geral, todos os derivados apresentaram meias vidas superiores quando submetidos a um tratamento alcalino, evidenciando maior susceptibilidade à inativação térmica do que pelo efeito alcalino do meio. Assim como observado para a inativação térmica, a construção de camadas poliméricas revestindo a lipase imobilizada sobre octil sepharose resultou em ganhos de estabilidade. Dentre os derivados construídos neste trabalho, destaca-se a construção OCT-PEI-DEXa (#20), sendo o derivado mais resistente à inativação térmica e o terceiro mais resistente ao efeito de um pH alcalino. Entretanto, o derivado que apresentou maior estabilidade em pH 10 foi referente à construção OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly, alcançando uma meia vida 184,3 h e um índice de estabilização de 70,1 em relação ao derivado controle.

Tabela VI.4. Estabilização dos derivados imobilizados das lipases de *B. gladioli* BRM58833 e *B. cepacia* em pH alcalino.

#	Suporte	Revestimento com polímeros		t _{1/2} (h)	Índice de estabilização alcalina
		Primeira camada	Segunda camada		
<i>B. gladioli</i> BRM58833 Lipase					
2	GLA-1	-	-	2,6	1,0
10	OCT	-	-	47,5	18,1
20	OCT	PEI 25 kDa	DEXa	85,8	32,6
21	OCT	PEI 25 kDa	DEXa (oxidado)	49,4	18,8
23	OCT	PAA 17,5 kDa	DEXa	53,0	20,2
24	OCT	PAA 17,5 kDa	DEXa (oxidado)	93,8	35,7
32	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{2 kDa} 250 mg.g ⁻¹	70,9	27,0
35	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG _{10 kDa} 250 mg.g ⁻¹	74,9	28,5
36	OCT	DEXa 10 mg.g ⁻¹	PEG ₁₀ /Gly	184,3	70,1
<i>B. cepacia</i> (Amano) Lipase					
15	GLA-cepacia	-	-	5,7	2,2 / 1,0*
16	OCT-cepacia	-	-	6,3	2,4 / 1,1*
26	OCT-cepacia	PEI 25 kDa	DEXa	18,6	7,1 / 3,3*
28	OCT-cepacia	PAA 17,5 kDa	DEXa	27,9	10,6 / 4,9*

* Índice de estabilidade calculado considerando GLA-cepacia como controle

3.3 Comparação com a lipase comercial de *B. cepacia*

A lipase de *B. cepacia* (Amano) foi utilizada como padrão para comparação com os resultados obtidos para a lipase de *B. gladioli* BRM58833. Assim, as mesmas condições de imobilização e estabilização que resultaram em maiores estabilidades para a lipase de *B. gladioli* BRM58833 foram reproduzidas com sua contraparte comercialmente disponível. Primeiramente, a lipase de *B. cepacia* foi imobilizada em agarose ativada com grupos glioxil para obter GLA-*cepacia* (Tabela VI.1, derivado #15), que, assim como GLA-1, representou a preparação mais semelhante à enzima livre e pôde ser usado como uma referência para comparações com outros derivados. A construção GLA-*cepacia* exibiu não apenas um maior rendimento e atividade expressa do que GLA-1, mas também foi 12,3 vezes mais estável (Figura VI.6a).

Posteriormente, a lipase de *B. cepacia* foi imobilizada em octil sepharose para obter OCT-*cepacia* (Tabela VI.1, derivado #16), pois este suporte resultou no melhor rendimento de imobilização e atividade expressa para a lipase de *B. gladioli* BRM58833. Conforme observado para OCT, OCT-*cepacia* também indicou um perfil de hiperativação com uma atividade final expressa de 114,3%. Em termos de estabilização, OCT-*cepacia* exibiu uma estabilização 15,9 vezes maior do que OCT (Figura VI.6b). Proporcionalmente, no entanto, a lipase de *B. gladioli* BRM58833 exibiu uma melhor atividade e estabilidade do que sua contraparte quando cada uma foi comparada às suas condições iniciais.

Finalmente, as condições utilizadas para revestir OCT com polímeros policatiônicos e DEXa foram replicadas para OCT-*cepacia*, uma vez que esses derivados foram os que resultaram nos maiores índices de estabilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833. Portanto, os derivados #25 a #28 foram obtidos da mesma maneira que suas contrapartes (Tabela VI.2). Assim como observado para OCT, OCT-*cepacia* também foi melhor estabilizado quando revestido em duas camadas (Figura VI.6c). Diferentemente, entretanto, a PAA serviu como um polímero de revestimento melhor que a PEI neste caso, resultando em um índice de estabilização de 27,8 quando comparado à GLA-*cepacia* e 358,7 quando comparado a GLA-1. Apesar de apresentar alto índice de estabilização quando comparado a GLA-1, proporcionalmente a

estabilização obtida para a lipase de *B. gladioli* BRM58833 foi superior à obtida para *B. cepacia* se comparadas cada uma com sua condição controle.

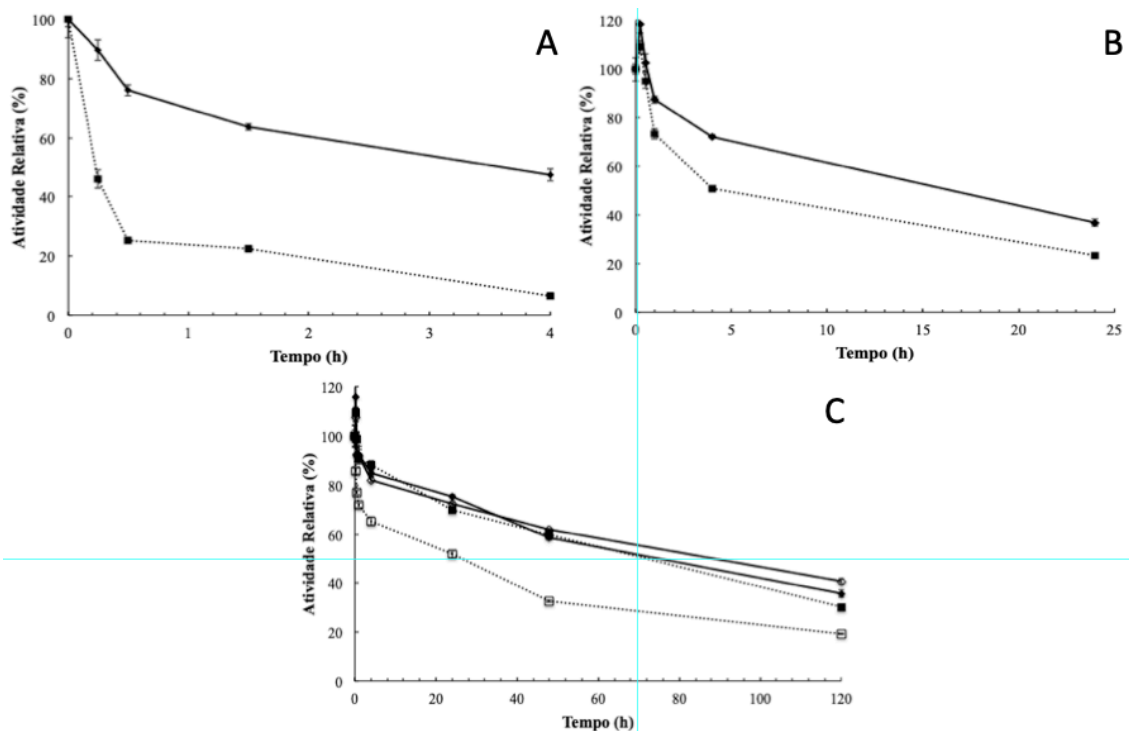


Figura VI.6. Curso de inativação térmica de derivados de lipases de *B. cepacia* (linhas sólidas) e *B. gladioli* BRM58833 (linhas pontilhadas). (A) Lipases immobilizadas em agarose ativada com grupos glioxil; (B) Lipases immobilizadas em octil sepharose; (C) Derivados revestidos de duas camadas: *B. cepacia* OCT-PEI-DEXa (diamante preenchido, linha sólida); *B. cepacia* OCT-PAA-DEXa (diamante vazio, linha contínua); *B. gladioli* BRM58833 OCT-PEI-DEXa (quadrado preenchido, linha pontilhada); *B. gladioli* BRM58833 OCT-PAA-DEXa (quadrado vazio, linha pontilhada).

3.4 Hidrólise do óleo de peixe

Após a imobilização e estabilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833 pela construção de derivados revestidos com polímeros, estes foram aplicados para a hidrólise de óleo de peixe. O óleo de peixe utilizado como substrato para a reação é rico em ácidos docosahexaenóicos (DHA) esterificados na forma de triacilgliceróis. Assim, a hidrólise deste óleo visou o enriquecimento da fração de DHA na forma de ácidos graxos livres, já que esta é a forma mais biodisponível para absorção pelo organismo humano.

Inicialmente, estudou-se a ação da lipase de *B. gladioli* BRM58833 imobilizada em octil sepharose em comparação às lipases de *B. cepacia* (Amano) e *Thermomyces lanuginosa* (Novozymes) imobilizadas nas mesmas condições (Figura VI.7). A lipase de *T. lanuginosa* é uma enzima conhecida por sua capacidade de hidrólise de PUFA's, tendo sido extensivamente aplicada a reações de hidrólise de óleo de peixe (Fernández-Lorente et al., 2011; Matuog et al., 2018) e, por este motivo, foi selecionada para comparação.

Quando os imobilizados foram obtidos considerando uma mesma carga enzimática sobre octil sepharose (1 mg.g^{-1}), foi observado um maior teor de DHA nas reações com o derivado de *B. cepacia*, alcançando uma concentração de DHA de $23,6 \pm 0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ em 48 h de reação, correspondente a 55,6% do teor máximo calculado. Já para os derivados de *T. lanuginosa* e *B. gladioli* BRM58833, foram encontrados 28,4 e 8,4% do teor máximo, respectivamente (Figura VI.7a). Por outro lado, quando a imobilização foi padronizada por atividade lipolítica oferecida ao suporte (60 U.g^{-1}), observou-se maior teor de DHA nas reações preparadas com a lipase de *T. lanuginosa*, alcançando 64,3% do teor máximo em 48 h de reação (Figura VI.7b). A obtenção de um derivado da lipase de *T. lanuginosa* pela padronização de atividade lipolítica frente ao *pNPP* resultou em uma hidrólise muito superior quando avaliado frente ao óleo de peixe. A lipase de *T. lanuginosa* apresenta pouca atividade em *pNPP* nas condições de ensaio utilizadas, necessitando uma carga protéica mais elevada para se equiparar com as lipases de *Burkholderia*. Assim, fica evidente a discrepância resultante da extrapolação da atividade lipolítica entre diferentes substratos.

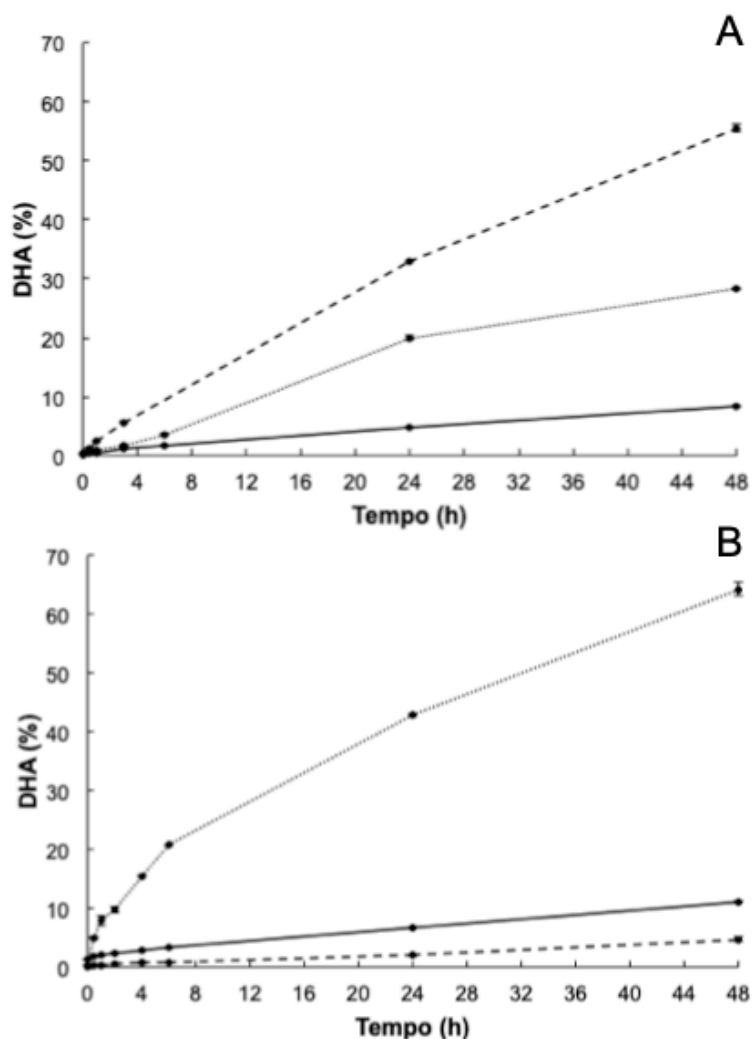


Figura VI.7. Hidrólise de óleo de peixe para obtenção de ácido docosahexaenóico. Comparação entre as lipases de *Thermomyces lanuginosa* (linha pontilhada), *Burkholderia cepacia* (linha tracejada) e *B. gladioli* BRM58833 (linha sólida) imobilizadas em octil sepharose. (A) Imobilização padronizada por carga enzimática de 1 mg de proteína por g de suporte; (B) Imobilização padronizada com 60 U por g de suporte.

A lipase de *B. gladioli* BRM58833 imobilizada em octil sepharose não obteve um desempenho competitivo para a hidrólise do óleo de peixe quando comparada às enzimas comerciais. A maior concentração de DHA obtida foi referente a $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}$ após 48 h de reação, equivalente a 8,4% do teor máximo calculado. A fim de avaliar a influência do uso de derivados estabilizados por recobrimento com polímeros, procedeu-se à hidrólise do óleo de peixe com os dois derivados que mais se destacaram por sua estabilidade. O derivado OCT-PEI-DEXa (#20) foi selecionado por sua estabilidade térmica e

o derivado OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly (#36) foi selecionado por sua estabilidade frente a ambientes alcalinos (Figura VI.8).

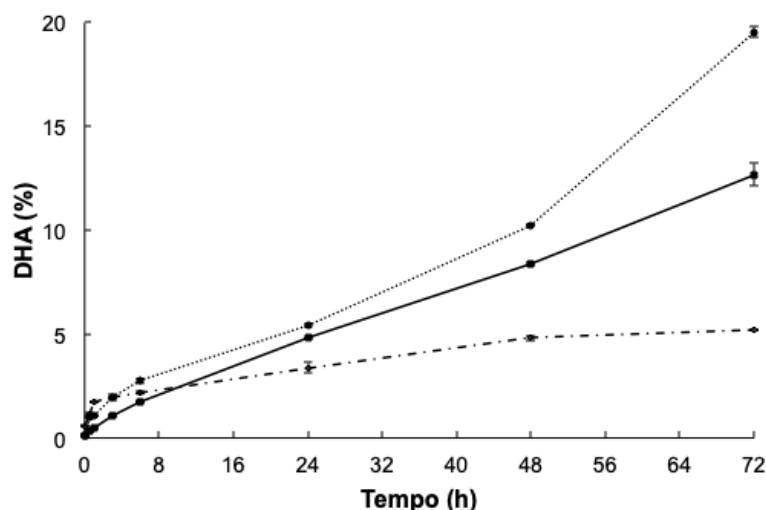


Figura VI.8. Uso de derivados estabilizados da lipase de *B. gladioli* BRM58833 para a hidrólise de óleo de peixe. Linha sólida: OCT; Linha tracejada: OCT-PEI-DEXa; Linha pontilhada: OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly.

Este estudo mostrou que a hidrólise catalisada pela lipase de *B. gladioli* BRM58833 resultou em concentrações bem-sucedidas de DHA com diferentes eficiências dependendo do derivado imobilizado utilizado. Após 72 h de reação, os teores de DHA obtidos para OCT, OCT-PEI-DEXa e OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly foram de 12,7%, 5,2% e 19,5%, respectivamente. Houve um aumento significativo no nível de DHA com o uso do derivado OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly, demonstrando o potencial da técnica de revestimento com polímeros bifuncionais para a obtenção de derivados mais estáveis e com maior capacidade catalítica.

Quando avaliadas as taxas de hidrólise iniciais, entretanto, os derivados da lipase de *B. gladioli* BRM58833 se aproximam a outros descritos na literatura, destacando o potencial das técnicas de estabilização (Tabela VI.5). As taxas de hidrólise iniciais de DHA obtidas para OCT são comparáveis às obtidas para CALB e RML imobilizadas em octil sepharose, de 0,068 e 0,053 U.mg⁻¹, respectivamente (Fernández-Lorente et al., 2011b). Além disso, os derivados revestidos com polímeros resultaram em taxas iniciais mais rápidas

do que sua contraparte apenas imobilizada. Considerando as condições do ensaio, OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly se destaca mais uma vez como um catalisador mais rápido e estável do que OCT.

Tabela VI.5. Hidrólise de óleo de peixes marinhos. A atividade é expressa como micromoles de DHA liberados por minuto e por miligrama de lipase imobilizada em uma hora de reação.

Derivado	Atividade (U.mg ⁻¹)
OCT-TLL	0,096 ± 0,011
OCT-cepacia	0,284 ± 0,001
OCT	0,057 ± 0,003
OCT-PEI-DEXa	0,207 ± 0,002
OCT-DEXa-PEG ₁₀ /GLY	0,127 ± 0,001

Em geral, entretanto, pode-se dizer que ainda há muito por se desenvolver até que a lipase de *B. gladioli* BRM58833 se torne competitiva com as enzimas comerciais concomitantemente avaliadas. Segundo Okada e Morrissey (2007), a conformação estrutural dos PUFAs, caracterizada por longas cadeias curvadas pela presença de consecutivas insaturações, pode representar um impedimento estérico para a atividade catalítica de algumas lipases. A curvatura das cadeias faz com que os grupos metil terminais dos PUFAs se aproximem muito às ligações éster da molécula de triacilglicerol, impedindo o alcance do sítio ativo e protegendo esses compostos da hidrólise catalisada pela lipase. Já para as cadeias relativamente retas dos ácidos graxos saturados e mono-insaturados, esse mesmo efeito não é observado. Assim, foi sugerido que os triacilgliceróis com PUFAs em sua composição sejam hidrolisados posteriormente aos triacilgliceróis sem estes compostos em sua composição devido ao reconhecimento da estrutura molecular do éster. Este fenômeno poderia explicar a baixa atividade dos derivados imobilizados da lipase de *B. gladioli* BRM58833 frente a estes substratos. Entretanto, novos estudos com maiores cargas enzimáticas e diferentes condições de reação serão necessários para demonstrar o potencial destas lipases na hidrólise de óleo de peixe.

4. Conclusões

A lipase obtida de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi eficientemente imobilizada e estabilizada por diferentes técnicas e abordagens. A imobilização em octil sepharose resultou em derivados com atividades e estabilidades mais altas. Após as técnicas de estabilização pós-imobilização, o derivado OCT-PEI-DEXa (#20) obteve o maior índice de estabilização térmica, o que representou um aumento de 263,8 vezes na estabilidade quando comparado à condição controle. Já quando avaliada sobre condições alcalinas, o derivado OCT-DEXa-PEG₁₀/Gly foi o mais estável, alcançando uma estabilidade 70,1 vezes maior que a obtida para a condição controle. Em termos de atividade e estabilidade, a lipase de *B. gladioli* BRM58833 não superou a lipase de *B. cepacia*. Entretanto, proporcionalmente a estabilização obtida para a lipase de *B. gladioli* BRM58833 foi superior à obtida para *B. cepacia* quando cada lipase foi comparada com seu respectivo controle. Resultados preliminares na hidrólise do óleo de peixe demonstraram o potencial da técnica de revestimento com polímeros bifuncionais formados por NH₂-PEG e glicina, resultando em um derivado estável e com maior capacidade catalítica para produção de PUFA ω -3. Este foi o primeiro estudo que relatou a construção de uma camada bifuncional desta maneira. Por fim, acredita-se que novos estudos na estabilização da lipase de *B. gladioli* BRM58833 possam melhorar sua resistência e, portanto, permitir seu reaproveitamento por mais ciclos de reação, preservando sua atividade e seletividade por longos períodos de tempo, reduzindo os custos associados ao uso dessas enzimas e possibilitando sua aplicação industrial.

CAPÍTULO VII – EXPRESSÃO HETERÓLOGA E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LIPASE BGL EM *ESCHERICHIA COLI*

1. Objetivos

Quando *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi cultivada por fermentação em estado sólido em farelo de trigo acrescido de óleo de soja, o secretoma resultante apresentou uma elevada atividade lipolítica. Análises posteriores demonstraram que a lipase BGL era responsável por grande parte da atividade catalítica do extrato. Deste modo, a lipase em questão foi selecionada para uma etapa de produção heteróloga, visando facilitar a obtenção e utilização desta enzima bem como a obtenção de uma enzima recombinante de categoria GRAS (*generally recognized as safe*). Assim, o objetivo deste trabalho foi a construção de vetores para a expressão heteróloga de BGL em *Escherichia coli* considerando diferentes estratégias de combinação dos genes *LIP* (codifica para a lipase) e *LIF* (codifica para a foldase específica, localizado *downstream* e adjacente a *LIP*) para a obtenção de grandes quantidades da enzima por meio da otimização do processo de produção.

2. Metodologia

2.1 Linhagens e meios de cultura

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho estão listadas abaixo:

- *Burkholderia gladioli* BRM58833 (Martins et al., 2021): wild type
- *Escherichia coli* DH5 α (New England BioLabs): *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44 Φ 80 Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*
- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen): *F ompT hsdS_B (r_B-m_B) dcm gal λ DE3 pLysS (CmR)*

O cultivo das bactérias foi feito em meio Luria-Bertani (0,5% extrato de levedura, 1% peptona e 1% NaCl). Para o cultivo em meio sólido foi acrescido

2% ágar ao preparo. Para o cultivo de bactérias transformadas com vetores contendo marca de seleção para antibióticos, foram adicionados ao meio de cultura 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ampicilina ou 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ cloranfenicol ou a combinação dos dois.

Quando avaliada a influência de diferentes meios de cultura na produção da lipase recombinante, foram utilizados os seguintes meios:

- Meio de auto indução: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% glicerol, 0,05% glicose, 0,2% lactose, Na_2HPO_4 25 mmol.L^{-1} , KH_2PO_4 25 mmol.L^{-1} , NH_4Cl 50 mmol.L^{-1} , Na_2SO_4 5 mmol.L^{-1} , MgSO_4 2 mmol.L^{-1} , FeCl_3 10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, CaCl_2 4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, MnCl_2 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, ZnSO_4 2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, CoCl_2 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, CuCl_2 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, NiCl_2 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Na_2MoO_4 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, Na_2SeO_3 0,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, H_3BO_3 0,4 nmol.L^{-1} (Studier, 2005);
- Terrific Broth (TB): glicerol 5 g.L^{-1} , triptona 12 g.L^{-1} , extrato de levedura 24 g.L^{-1} , KH_2PO_4 2,31 g.L^{-1} e K_2HPO_4 12,54 g.L^{-1} ; pH 7,0 (Collins et al., 2013);
- Super Broth (SB): glicerol 5 g.L^{-1} , triptona 35 g.L^{-1} , extrato de levedura 20 g.L^{-1} , KH_2PO_4 2,31 g.L^{-1} e K_2HPO_4 12,54 g.L^{-1} ; pH 7,0 (Collins et al., 2013);
- Meio Mínimo (M9): Na_2HPO_4 0,85 g.L^{-1} , NH_4Cl 1,0 g.L^{-1} , KH_2PO_4 3,0 g.L^{-1} , NaCl 0,5 g.L^{-1} , MgSO_4 0,24 g.L^{-1} ; pH 7,0 (Collins et al., 2013);
- Modified Super Optimal Broth (SOC): glicose 4 g.L^{-1} , triptona 20 g.L^{-1} , extrato de levedura 5 g.L^{-1} , NaCl 0,58 g.L^{-1} , KCl 0,186 g.L^{-1} , MgSO_4 2,46 g.L^{-1} , MgCl_2 2 g.L^{-1} ; pH 7,0 (Collins et al., 2013)

2.2 Amplificação de Lip e Lif por PCR

Inicialmente a bactéria *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi cultivada em meio LB a 28 °C por 16 h. Em seguida, as células foram peletizadas para extração de DNA genômico com o kit *QIAGEN DNA extraction* conforme instruções do fabricante. A amplificação de fragmentos por PCR foi realizada utilizando os conjuntos de primers apresentados na Tabela VII.1. Cada reação foi preparada para um volume final de 50 μL contendo dNTP 0,2 mmol.L^{-1} ,

primers forward e reverso 0,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, e DNA genômico 200 ng. A enzima utilizada foi a Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs) considerando uma unidade por reação em tampão GC (New England BioLabs) apropriadamente diluído. Os parâmetros para amplificação foram os seguintes: desnaturação inicial a 98 °C por 30 s, seguida por 30 ciclos de desnaturação a 98 °C por 10 s, anelamento a 65 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Por fim, foi realizada uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min.

Tabela VII.1. Sequência dos primers utilizados neste trabalho. Em minúsculo são apresentadas as sequências para recombinação com o vetor. As sequências dos sítios de restrição são apresentadas sublinhadas.

Primer	Sequência (5'→3')	Sítio de restrição
BgLip-F	aggagatat <u>catatg</u> ATGCGCAGATCGATGCGTTC	NdeI
BgLip-R	ggtggtggtg <u>ctcgag</u> GATGCCCTGCTGCTTGAGG	XhoI
BgLip-R2	ggtggtggtg <u>ctcgag</u> TCAGATGCCCTGCTGCTTGAGG	XhoI
BgLif-R	ggtggtggtg <u>ctcgag</u> TTCGCTTCCTCGCCGGCTA	XhoI

2.3 Eletroforese em gel de agarose

Para separação e visualização do material genético, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris 40 mmol.L^{-1} , ácido acético 20 mmol.L^{-1} , EDTA 1 mmol.L^{-1} , pH 8,0) a 90 V por uma hora. As bandas foram visualizadas sob luz UV por intercalação com brometo de etídio (Sambrook et al., 2001).

2.4 Construção dos vetores

A montagem das diferentes construções foi feita através da inserção de fragmentos obtidos com diferentes combinações de pares de primers, totalizando três estratégias distintas: 1) Amplificação do gene *LIP* com inserção de His-tag na porção C-terminal (BgLip-F + BgLip-R); 2) Amplificação do gene *LIP* (BgLip-F + BgLip-R2); e 3) Amplificação do operon completo contendo o gene da lipase *LIP* e o gene da chaperona *LIF* (BgLip-F + BgLif-R). Em todos

os casos foi considerada a sequência original retirada do genoma de *B. gladioli* BRM58833 (Anexo IV).

Após a obtenção dos fragmentos, estes foram inseridos no vetor pET-21a+ por recombinação *in vitro* através das sequências homólogas ao vetor. Para isso, foi utilizado o kit *In-Fusion HD EcoDry Cloning* (Takara Bio) conforme instruções do fabricante.

2.5 Confirmação das sequências das construções

A confirmação da exatidão das construções foi feita por sequenciamento através do método de Sanger por meio da prestação de serviços da empresa Myleus Biotecnologia (Belo Horizonte). Alternativamente, a conferência foi feita por meio da digestão dos plasmídeos com enzimas de restrição. Para isso, foram utilizadas duas estratégias: 1) digestão com EcoRV; e 2) digestão com NdeI e XhoI.

2.6 Preparo de células DH5α competentes e transformação

Uma colônia isolada de *Escherichia coli* DH5α foi inoculada em 10 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 16 h sob agitação. Sequencialmente, 100 mL de meio LB foram inoculados com 2% de pré-inóculo, sendo esta cultura incubada a 37 °C sob agitação até atingir uma densidade óptica (O.D.₆₀₀) de 0,3. Após resfriamento da cultura em banho de água gelada, o volume foi centrifugado por 15 min a 3.000 x g e 4 °C para coleta das células. Em seguida, em ambiente estéril, as células foram ressuspensas em 32 mL de solução contendo RbCl 12 g.L⁻¹, MnSO₄ 9,9 g.L⁻¹, acetato de potássio 30 mmol.L⁻¹, CaCl₂ 1,5 g.L⁻¹ e glicerol 150 g.L⁻¹ em pH 5,8 e permaneceram incubadas em gelo por 15 min. A seguir, as células foram centrifugadas por 15 min a 3.000 x g e 4 °C e o pellet obtido foi ressuspensado em 4 mL de tampão de transformação (MOPS 20 mmol.L⁻¹; RbCl 1,2 g.L⁻¹, CaCl₂ 11 g.L⁻¹ e glicerol 150 g.L⁻¹ em pH 6,8). Por fim, as células foram divididas em alíquotas de 100 µL e armazenadas a -80 °C.

A transformação por choque térmico foi feita em células competentes de *E. coli* DH5α. Adicionou-se 1 µL do plasmídeo contendo a construção de interesse a uma alíquota de 100 µL de células competentes em gelo, onde

permaneceram incubadas por 30 min. Em seguida, as células foram submetidas a uma temperatura de 42 °C por 90 s. Em seguida, as células foram imediatamente transferidas para o gelo. Por fim, adicionou-se 1 mL de meio LB e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C, sendo posteriormente plaqueadas em meio LB contendo a marca de seleção apropriada.

2.7 Extração de DNA plasmidial

Para a extração de DNA plasmidial em pequena escala, foi utilizado método adaptado de Sambrook e colaboradores (2001). Após cultivo da bactéria contendo o plasmídeo de interesse em meio LB acrescido do antibiótico correspondente a 37 °C por 16 h, 3 mL da cultura foram coletados e centrifugados a 10.000 x g por dois min para a obtenção das células. Em seguida, o pellet foi ressuscitado em 200 µL de tampão Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8,0 acrescido de EDTA 10 mmol.L⁻¹ aos quais foram adicionados 360 µL de solução de lise gelada (NaOH 0,2 mol.L⁻¹; SDS 1% m/v). Este material foi homogeneizado e incubado a 25 °C por 5 min. Após a lise, foram adicionados 300 µL de solução gelada contendo acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ e ácido acético 2 mol.L⁻¹ e a amostra foi homogeneizada e incubada em gelo por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram homogeneizadas com 750 µL de isopropanol para precipitação do material genético. Em sequência, as amostras foram submetidas à centrifugação por mais 5 min a 10.000 x g e o sobrenadante descartado. O pellet resultante foi ressuscitado em 200 µL de solução tampão Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8,0 acrescida de EDTA 10 mmol.L⁻¹ e a este volume foram adicionados 110 µL de acetato de amônio 7,5 mol.L⁻¹ com mais uma etapa de homogeneização e centrifugação a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante resultante foi, então, coletado e acrescido de 750 µL de etanol P.A. gelado e submetido novamente à centrifugação por 5 min a 10.000 x g. Por fim, o pellet obtido foi lavado com 750 µL de etanol 70% seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min. O pellet resultante foi correspondente à fração de DNA plasmidial bacteriano e, após secagem a temperatura ambiente, foi ressuscitado em 50 µL de água Milli Q, tratado com RNase A (10 µg.mL⁻¹) a 37 °C por 15 min e armazenado a -20 °C.

2.8 Preparo de células competentes BL21(DE3)pLysS e transformação

Uma colônia isolada de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS foi inoculada em 5 mL de meio LB acrescido de cloranfenicol $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubada a 37°C por 16 h sob agitação. Sequencialmente, 40 mL de meio LB igualmente suplementado com cloranfenicol foram inoculados com 1% de pré-inóculo, sendo esta cultura incubada a 37°C sob agitação até atingir uma densidade óptica (O.D._{600}) de 0,3, momento em que a cultura foi centrifugada por 10 min a $3.000 \times g$ e 4°C para coleta das células. Em seguida, em ambiente estéril, as células peletizadas foram submetidas a dois ciclos de lavagem que consistiram em incubação no gelo em 15 mL de CaCl_2 100 mmol.L^{-1} seguida de centrifugação por 10 min a $3.000 \times g$ e 4°C . Ao final do segundo ciclo, as células foram ressuspensas em 1 mL de solução de transformação (CaCl_2 100 mmol.L^{-1} ; glicerol 15%), onde permaneceram incubadas no gelo por 1 hora. Por fim, as células foram divididas em alíquotas de 100 μL e armazenadas a -80°C . O protocolo para transformação por choque térmico consistiu do mesmo processo descrito no item 2.6.

2.9 Avaliação qualitativa da produção de lipases em meios seletivos

A produção de lipases pelas linhagens transformadas em BL21(DE3)pLysS foi avaliada qualitativamente nos meios Trioleína/Azul do Nilo A (ágar nutriente 8 g.L^{-1} ; trioleína 0,25% v/v; corante Azul do Nilo A 0,01% m/v; e ágar 20 g.L^{-1} ; pH 7,0), Óleo de Oliva/Rodamina B (ágar nutriente 8 g.L^{-1} ; óleo de oliva 2% v/v; corante Rodamina B 0,007% m/v; e ágar 20 g.L^{-1} ; pH 7,0) e Tributirina/Vermelho Fenol (peptona 0,5%; extrato de levedura 0,3%; tributirina 0,5%; e ágar 20 g.L^{-1} ; pH 6,0). Em seguida aos preparos e esterilização, os meios foram homogeneizados por 10 min até formar uma emulsão estável que foi distribuída em placas de Petri.

2.10 Testes de expressão

As colônias transformadas que tiveram resultado positivo nos testes qualitativos foram pré inoculadas em um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio LB com ampicilina $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e cloranfenicol $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo cultivadas sob agitação constante de 200 rpm e temperatura de 37°C durante

a noite. Sequencialmente, inoculou-se 1% de pré-inóculo a um frasco contendo meio LB com as mesmas marcas de seleção. Esta cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm e temperatura de 37 °C até que fosse alcançada uma densidade óptica referente à fase log de crescimento ($O.D._{600} = 0,5$). Em seguida, induziu-se a produção das proteínas de interesse com adição de isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1 mmol.L⁻¹. Após indução, as culturas foram mantidas sob agitação constante de 200 rpm a 37 °C e a produção da lipase foi avaliada para todas as frações celulares por meio de ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica (item 2.12).

2.11 Fracionamento celular

Foram investigadas quatro frações celulares para buscar atividade lipolítica: fração extracelular, fração periplasmática, fração intracelular solúvel e fração intracelular insolúvel. Após indução e 2 h de cultivo, a cultura foi centrifugada a 8.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante coletado desta centrifugação foi correspondente à fração extracelular. Em seguida, as células obtidas foram ressuspensas lentamente e com cuidado em 12% do volume original da cultura em tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹ e sacarose 20% m/v em pH 8,0. Após 10 min de incubação em gelo sob leve agitação o material foi centrifugado a 8.000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet obtido foi novamente ressuspendido com cuidado em 5% do volume original da cultura em solução de MgCl₂ 5 mmol.L⁻¹. Então, o material foi novamente incubado por 10 min em gelo sob leve agitação, sendo, em sequência, centrifugado a 8.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante desta centrifugação foi correspondente à fração periplasmática. Para a obtenção da fração intracelular, as células resultantes foram ressuspensas em 10% do volume original da cultura em tampão fosfato de sódio 25 mmol.L⁻¹ em pH 7,0 acrescido de lisozima 200 μ g.mL⁻¹ e inibidor de protease (Roche) e o conjunto foi incubado a 37 °C por 30 min. Em seguida, as células foram sonicadas em gelo com 15 pulsos de 50 kHz por 10 s intervalados por 1 min de descanso. O extrato obtido foi centrifugado a 8.000 x g por 10 min a 4 °C e foram coletados *pellet* e sobrenadante, correspondentes às frações intracelulares insolúveis e solúveis, respectivamente.

2.12 Ensaio enzimático para determinação de atividade lipolítica

A atividade lipolítica das frações obtidas foi determinada conforme procedimento descrito no item 2.7.1 do capítulo I, considerando o uso de microplacas ao invés de cubetas.

2.13 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

Para a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e zimograma, as amostras foram tratadas conforme procedimento descrito no item 2.13 do capítulo III.

3. Resultados e Discussão

3.1 Construção dos sistemas de expressão

A expressão de proteínas heterólogas é uma estratégia interessante no contexto de obtenção de enzimas de interesse industrial. Inicialmente, deve-se levar em consideração que a escolha do sistema de expressão necessita ser acompanhada de um desenho adequado do cassete de expressão, incluindo a escolha do tipo de promotor, da existência de um sinal de secreção, a característica do gene de interesse, a escolha de uma *tag* fusionada e o terminador. Outros fatores a serem considerados são também os tipos de vetor e marca de seleção a serem utilizados.

Para a expressão da lipase de *B. gladioli* BRM58833 foi escolhida a bactéria *Escherichia coli*. Dentre os motivos para a seleção desta bactéria como sistema de expressão destacam-se: 1) a não necessidade de nutrientes complexos para seu crescimento; 2) o crescimento simples, rápido e de baixo custo; 3) a facilidade de manipulação genética com a utilização de vetores disponíveis comercialmente; 4) a facilidade de reconhecimento das sequências genéticas originais de *B. gladioli* sem necessidade de otimização de códons; e 5) presença da maquinaria celular adequada para o processo de produção e secreção da enzima, já que a lipase é originária também de uma bactéria Gram-negativa.

O plasmídeo utilizado neste trabalho foi o pET-21a+ (Figura VII.1), um vetor não-integrativo de 5,4 kb e com marca de seleção que confere resistência à ampicilina. O promotor contido no cassete de expressão é o promotor T7, reconhecido pela RNA polimerase T7, que tem sua produção induzida na célula hospedeira pela adição de lactose ou análogos sintéticos, como o IPTG.

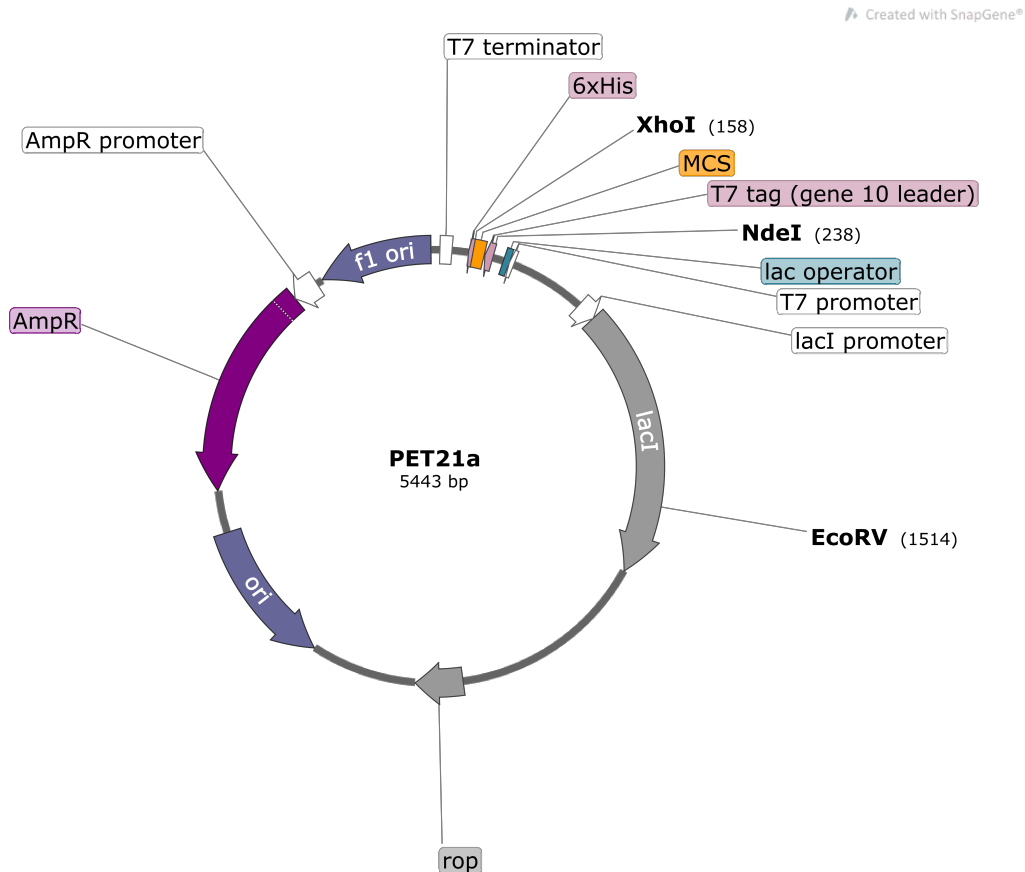


Figura VII.1. Mapa do vetor pET-21a+. Os sítios de restrição são indicados pela anotação das enzimas utilizadas neste trabalho. T7 promoter: promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 para a transcrição da proteína heteróloga; Lac operator: sítio de ligação do repressor lac inibindo a transcrição em *E. coli* até que a produção seja induzida por adição de lactose/IPTG; T7 tag: sequência para fusão de tag peptídica; MCS: sítio de clonagem múltipla; 6xHis: sequência para fusão de cauda de poli-histidina; T7 terminator: terminador da transcrição do gene para RNA polimerase do bacteriófago T7; F1 Ori: origem de replicação do bacteriófago f1; AmpR promoter: promotor para transcrição da marca de seleção dominante; AmpR: gene *bla* para síntese de β -lactamase, que confere resistência à ampicilina; Ori: origem de replicação; Rop: gene da proteína rop, responsável por manter o plasmídeo em baixo número de cópias.

O gene *LIP*, que codifica para a lipase de *B. gladioli* BRM58833, está presente no genoma da bactéria na forma de um operon bicistrônico. Assim como relatado na literatura para outras espécies membro dos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, o gene *LIP* é seguido do gene *LIF*, que codifica para a foldase específica da lipase (Jørgensen *et al.*, 1991; Hobson *et al.*, 1993). Em um estudo realizado por Ogino e colaboradores (2013), demonstrou-se que a expressão da lipase de *Pseudomonas aeruginosa* na sua forma ativa é dependente da co-expressão da sua foldase específica. Assim, a fim de confirmação que o mesmo fenômeno ocorre em *B. gladioli*, foram propostas três estratégias de produção da lipase:

- Estratégia 1: amplificar e inserir o gene *LIP* fusionado a uma cauda de poli-histidina sob controle do promotor T7 em pET-21a+. A inclusão de uma *tag* partiu da ideia de que, caso expressa em sua forma ativa, a lipase poderia ser purificada facilmente por meio de técnica cromatográfica por afinidade ao Ni²⁺;
- Estratégia 2: amplificar e inserir o gene *LIP* sem modificações e também sob controle do promotor T7 em pET-21a+; e
- Estratégia 3: amplificar o operon completo contendo os genes *LIP* e *LIF* em sua forma original. Assim como para as estratégias anteriores, o operon foi inserido sob controle do promotor T7 em pET-21a+.

Planejadas as estratégias de montagem dos vetores, iniciou-se a etapa de amplificação dos genes por PCR. Após algumas tentativas de amplificação dos fragmentos testando diversas polimerases e condições de amplificação mal sucedidas (dados não mostrados), os fragmentos puderam ser amplificados com sucesso considerando o uso da *Phusion Taq* (New England BioLabs) em conjunto com o tampão GC fornecido em conjunto com a enzima (Figura VII.2). Com o uso dos oligonucleotídeos para a amplificação dos fragmentos em questão, adicionaram-se em cada extremidade, 16 pb de homologia em relação ao plasmídeo pET-21a+. À extremidade amplificada pelo primer *forward* adicionou-se ainda um sítio de restrição para NdeI e à extremidade amplificada pelo primer reverse adicionou-se um sítio de restrição para XhoI.

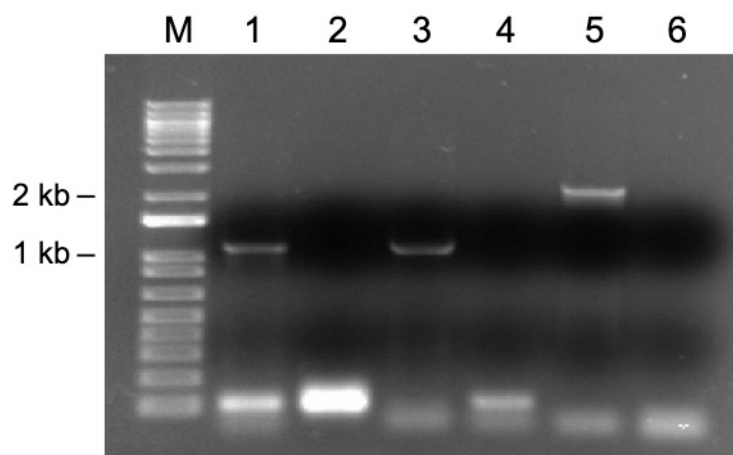


Figura VII.2. Amplificação dos fragmentos *LIP*-his (1074 pb, linha 1), *LIP* (1077 pb, linha 3) e *LIP-LIF* (2139 pb, linha 5). As linhas 2, 4 e 6 correspondem ao controle negativo das reações mostradas em 1, 3 e 5, respectivamente. M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Após a obtenção dos fragmentos com inserção dos sítios de homologia ao vetor, estes foram inseridos no vetor pET-21a+, previamente linearizado com as enzimas correspondentes aos sítios de restrição adicionados, por recombinação *in vitro* através das sequências homólogas ao vetor. Assim, foram obtidos os vetores pET-LIP-his, pET-LIP e pET-LIP-LIF (Figuras VII.3 a 5).

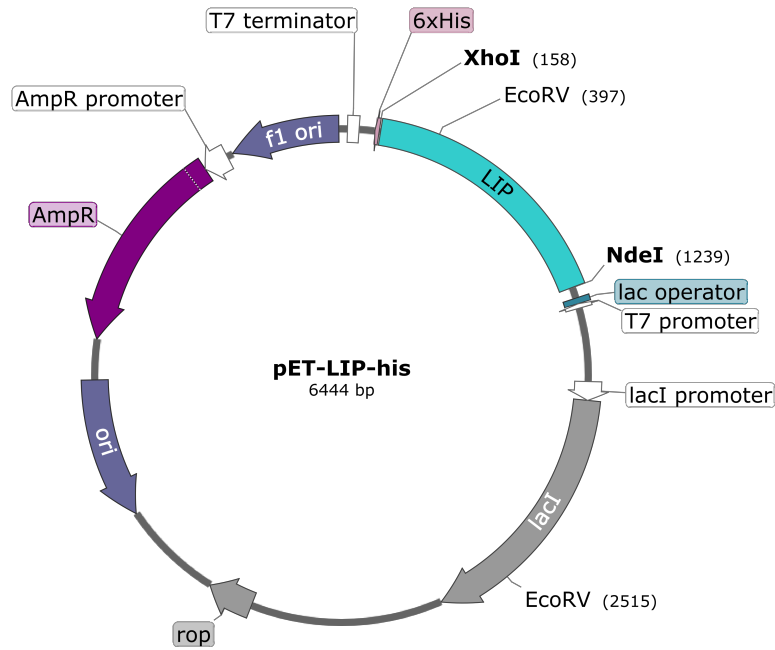


Figura VII.3. Mapa do vetor pET-LIP-his. Estão indicados os sítios de restrição de NdeI e XhoI utilizados para inserção do fragmento *LIP* e os sítios de restrição para EcoRV, utilizado para conferência da construção por digestão.

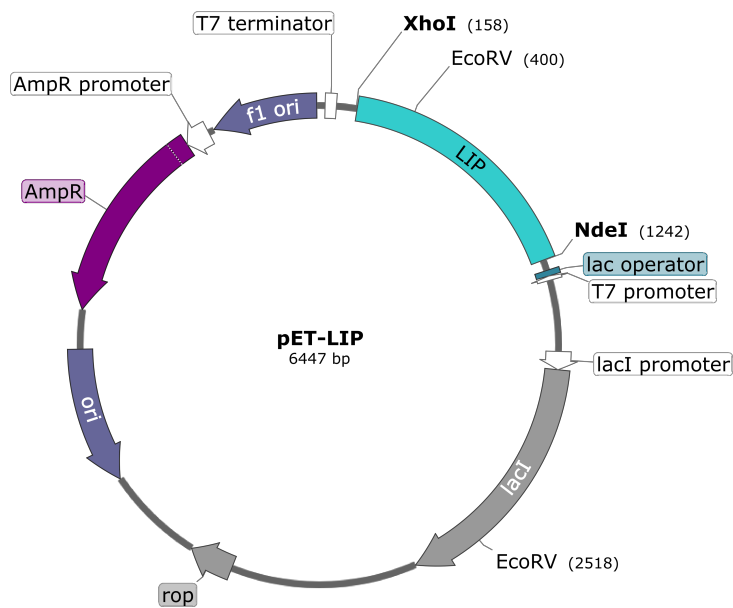


Figura VII.4. Mapa do vetor pET-LIP. Estão indicados os sítios de restrição de NdeI e XhoI utilizados para inserção do fragmento *LIP* e os sítios de restrição para EcoRV, utilizado para conferência da construção por digestão.

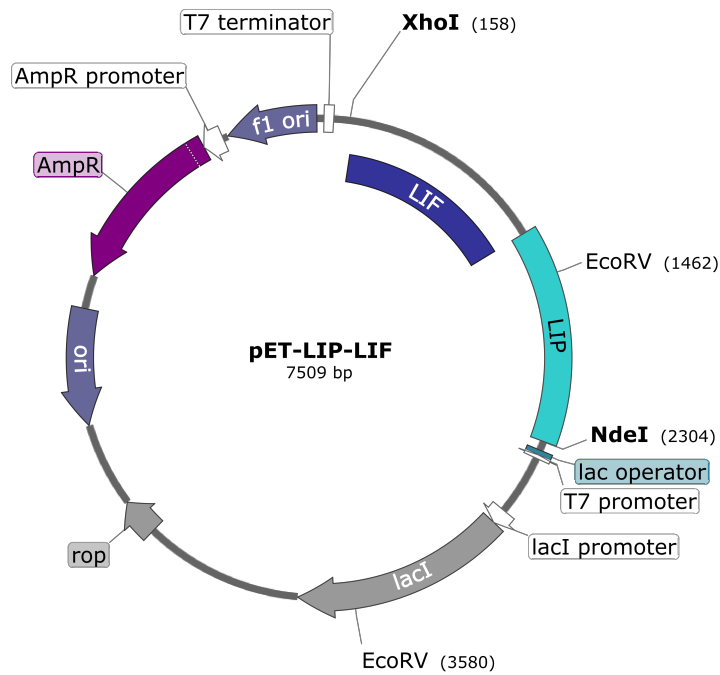


Figura VII.5. Mapa do vetor pET-LIP-LIF. Estão indicados os sítios de restrição de NdeI e XhoI utilizados para inserção do operon *LIP-LIF* e os sítios de restrição para EcoRV, utilizado para conferência da construção por digestão.

As construções foram confirmadas por sequenciamento pelo método de Sanger e por digestão com NdeI e XhoI (cada uma com apenas um sítio de restrição nas extremidades dos fragmentos, resultando em uma banda correspondente ao tamanho do fragmento e a uma banda correspondente ao vetor linearizado) e com EcoRV (com um sítio de restrição em *lacI* e outro em *LIP*, resultando em uma banda correspondente ao fragmento de 2118 pb e a outra banda correspondente ao restante do vetor linearizado) (Figura VII.6).

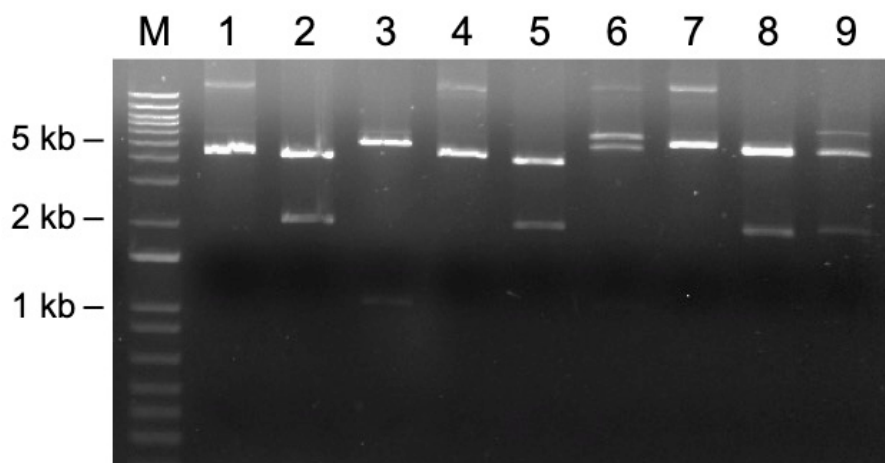


Figura VII.6. Linearização dos vetores construídos. M: marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); 1: pET-LIP intacto; 2: pET-LIP digerido com EcoRV; 3: pET-LIP digerido com NdeI e XhoI; 4: pET-LIP-his intacto; 5: pET-LIP-his digerido com EcoRV; 6: pET-LIP-his digerido com NdeI e XhoI (digestão incompleta); 7: pET-LIP-LIF intacto; 8: pET-LIP-LIF digerido com EcoRV; e 9: pET-LIP-LIF digerido com NdeI e XhoI (digestão incompleta).

3.2 Triagem de clones produtores de lipase

Confirmadas as construções, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3)pLysS e os transformantes foram semeados em meio LB ágar para estoque e manutenção dos clones. Inicialmente, foi realizada uma avaliação qualitativa da produção da lipase recombinante, semeando-se os clones obtidos em placas com meios seletivos. A formação de halos de hidrólise nos três meios avaliados foi observada apenas para os clones contendo a construção que continha o operon completo *LIP-LIF*, corroborando os dados da literatura e demonstrando a essencialidade da co-expressão da foldase específica para lipase (Figura VII.7).

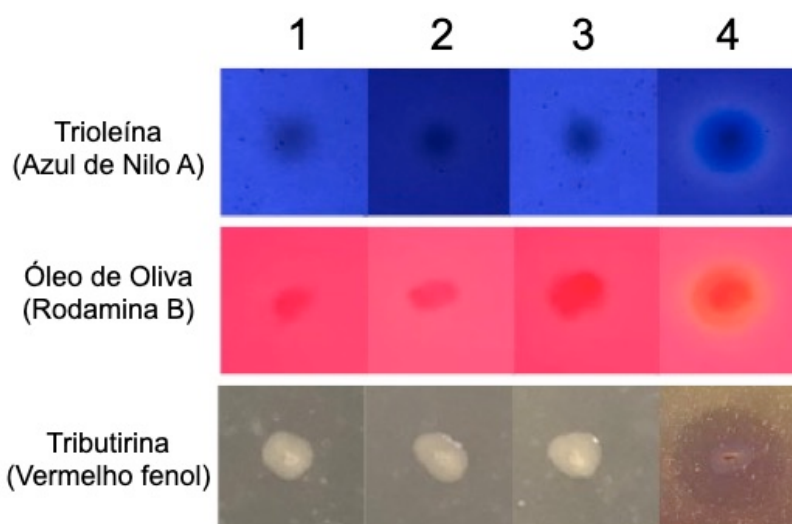


Figura VII.7. Avaliação qualitativa da produção de lipases. 1: controle negativo (linhagem de BL21(DE3)pLysS transformada com pET-21a+); 2: pET-LIP; 3: pET-LIP-his; e 4: pET-LIP-LIF.

Concomitantemente à análise qualitativa em meios seletivos, foram selecionados um clone correspondente a cada construção para indução em meio líquido. Após a indução com adição de IPTG, os cultivos foram mantidos por 2 h para que houvesse a produção da lipase recombinante. Em seguida, uma alíquota das células foi coletada e as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e zimograma (Figura VII.8).

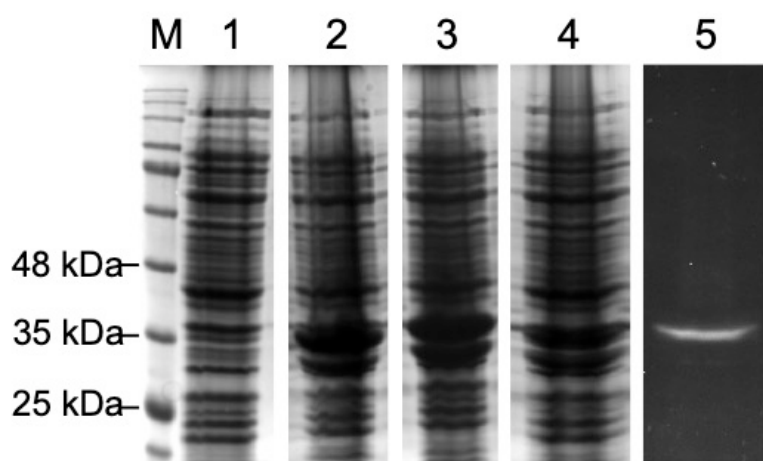


Figura VII.8. Avaliação da produção de lipases por SDS-PAGE e zimograma nas frações intracelulares após indução com IPTG por 2 h. M: marcador de massa molecular; 1: pET-21a+; 2: pET-LIP; 3: pET-LIP-his; 4: pET-LIP-LIF; e 5: zimograma correspondente ao cultivo da linhagem transformada com pET-LIP-LIF.

O tamanho esperado para a lipase de *B. gladioli* é de 36 kDa. Os resultados da análise por SDS-PAGE demonstram a existência de uma banda com tamanho similar para todas as linhagens transformadas com as construções e ausência de uma banda com tamanho expressivo na amostra referente ao controle negativo, indicando que, a lipase foi produzida por todas as construções avaliadas. A análise zimográfica, entretanto, demonstrou novamente que apenas a construção que continha a foldase específica resultou em uma lipase ativa, validando os resultados obtidos para halos de hidrólise em meios seletivos.

A sequência do operon utilizada para a construção pET-LIP-LIF é correspondente à sequência original extraída de *B. gladioli* BRM58833 (Anexo IV). É interessante notar que o gene *LIF* se encontra em uma fase de leitura distinta do gene *LIP* (fase 2), sendo o último nucleotídeo de *LIP* o mesmo que funciona como o primeiro de *LIF*. Estima-se que aproximadamente um terço dos genes procarióticos participem de alguma sobreposição no contexto dos genomas bacterianos, sendo este um evento comum (Johnson e Chrisholm, 2004). A inexistência de um espaçador entre os genes sobrepostos representa o resultado de um processo evolutivo que contribui para um genoma mais enxuto, decorrendo em novas restrições evolutivas nas sequências das regiões de sobreposição. Outrossim, a sobreposição pode ter uma função de regulação gênica, proporcionando um maior controle dos genes sobrepostos por uma co-regulação em nível transcricional e traducional (Luo et al., 2013; Huvet e Stumpf, 2014). A necessidade desta regulação se torna mais evidente no caso em questão, onde *LIP* é dependente de *LIF*. Para solucionar a situação de diferentes fases de leitura, hipotetiza-se que a porção terminal de *LIP* (10 pb *upstream* do início de *LIF*) funcione como uma sequência Shine-Dalgarno, possibilitando o reconhecimento e associação da subunidade 30S do ribossomo ao mRNA bicistrônico e a tradução da foldase.

Havendo sido a única construção com capacidade de produção da lipase em sua forma ativa, decidiu-se por dar sequência ao trabalho na parte de otimização da produção apenas com a linhagem BL21(DE3)pLysS transformada com pET-LIP-LIF.

3.3 Otimização da produção da lipase

O fragmento composto pelo operon lipase/foldase de *B. gladioli* BRM58833 foi inserido em sua sequência original no vetor para que pudesse ser expressado por *E. coli*. Análises bioinformáticas (SignalP 4.1) destacam a presença de uma sequência peptídeo sinal, destinando a lipase para secreção no meio extracelular. Estudos prévios confirmaram que em cultivo por fermentação em estado sólido a bactéria *B. gladioli* BRM58833 é capaz de secretar a enzima (Martins et al., 2021). Apesar de *E. coli* não ser reconhecida como um organismo com alta capacidade de secreção, sabe-se que esta bactéria contém a maquinaria necessária a este processo. Assim, propôs-se inicialmente uma investigação da sublocalização celular a qual a lipase estava sendo destinada nas condições de indução utilizadas até então. Deste modo, após cultivo e indução com IPTG por 2 h a cultura obtida foi fracionada em suas porções extracelular, periplasmática, intracelular solúvel e intracelular insolúvel. O resultado obtido para a separação eletroforética das proteínas é apresentado na Figura VII.9.

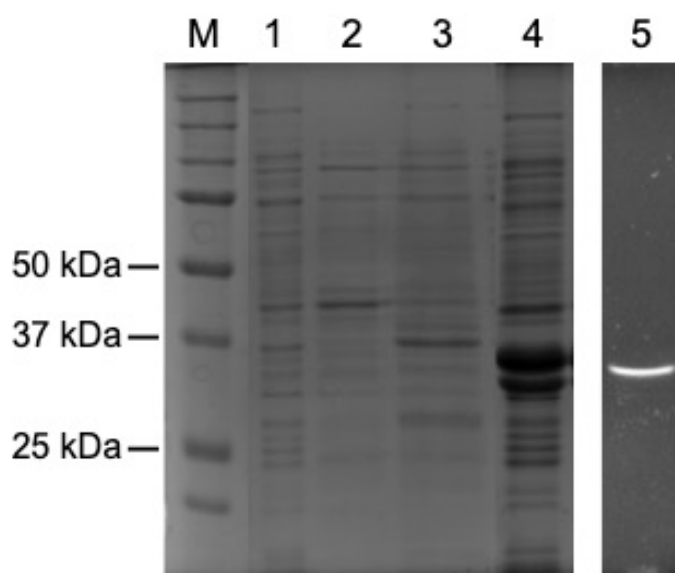


Figura VII.9. Análise do fracionamento celular por SDS-PAGE e zimograma do cultivo da linhagem transformada com pET-LIP-LIF. M: marcador de massa molecular; 1: fração intracelular solúvel; 2: fração periplasmática; 3: fração extracelular; 4: fração intracelular insolúvel; e 5: zimograma referente à fração intracelular insolúvel.

Observou-se que, para as condições de indução utilizadas até então, ocorria uma intensa produção da lipase. Entretanto, a análise por zimograma revelou que a atividade catalítica estava presente apenas na fração intracelular insolúvel. Quando avaliada quantitativamente pelo método de hidrólise do *p*NPP, não foi detectada atividade lipolítica para nenhuma das frações.

Estudos tem reportado que condições de indução muito fortes podem favorecer a formação de corpos de inclusão da proteína superexpressa em *E. coli* (Slouka et al., 2018). Algumas das estratégias comumente empregadas na literatura podem ser a avaliação de diferentes meios de cultura e condições de cultivo. Sabe-se que o cultivo em temperaturas mais baixas provoca uma redução na taxa metabólica deste microrganismo mesófilo, resultando em menor velocidade de replicação da bactéria, e produção e processamento mais lentos da proteína superexpressa. No mesmo sentido, uma estratégia alternativa consiste da indução com quantidades menores de IPTG.

Deste modo, decidiu-se por uma estratégia de otimização da produção da lipase, visando alcançar níveis mais expressíveis e detectáveis de atividade lipolítica extracelular pelo método de hidrólise do *p*NPP. Neste sentido, o primeiro passo foi avaliar o cultivo da *E. coli* transformada em diferentes meios de cultura (Figura VII.10).

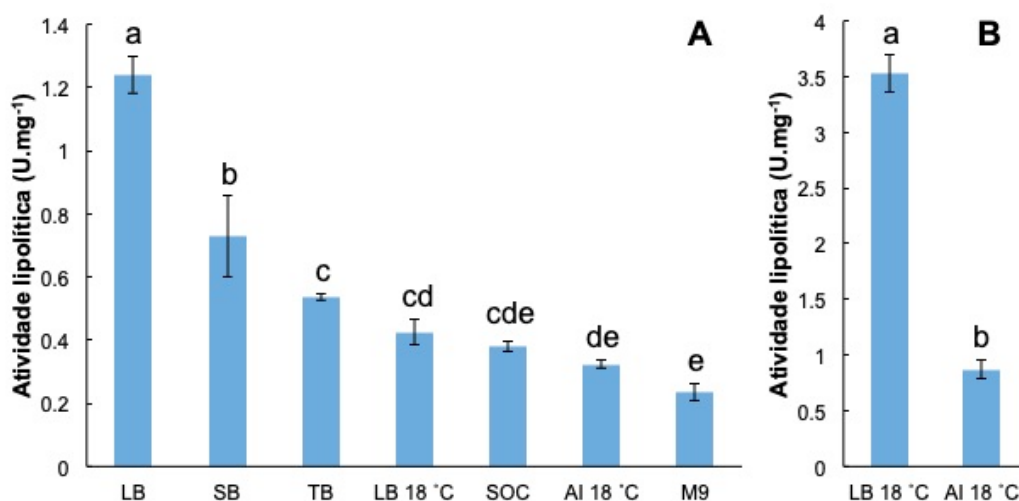


Figura VII.10. Atividades lipolíticas intracelular (A) e extracelular (B) obtidas para a linhagem *p*ET-LIP-LIF em diferentes meios de cultura. TB: *terrific broth*; SB: *super broth*; M9: meio mínimo; SOC: *modified super optimal broth*; LB: Luria-Bertani; e AI: meio de auto indução. As letras representam igualdades estatísticas (Teste de Tukey, nível de significância 5%).

Nas condições testadas, a atividade lipolítica específica intracelular (Figura VII.10a) foi maior para o cultivo de pET-LIP-LIF em meio LB, atingindo um valor de $1,24 \pm 0,06 \text{ U.mg}^{-1}$. O valor obtido para a indução com IPTG por 2 h em cultivo a 37°C em meio LB foi estatisticamente diferente do segundo mais alto, obtido para cultivo em meio SB. O meio mínimo M9 foi o que resultou em menor atividade lipolítica intracelular quando avaliado pelo método de hidrólise do pNPP. Ao ser avaliada a fração extracelular (Figura VII.10b), apenas as condições de cultivo em meio LB com indução com IPTG por 24 h a 18°C e o cultivo em meio de auto indução também realizado por 24 h a 18°C resultaram em quantidades detectáveis de atividade lipolítica. A maior atividade lipolítica foi obtida para a fração extracelular do cultivo em meio LB em baixa temperatura, atingindo um valor de $3,52 \pm 0,16 \text{ U.mg}^{-1}$. Este valor é 8,3 vezes mais elevado que a atividade lipolítica encontrada para a fração intracelular correspondente ao mesmo cultivo. Se comparada à melhor condição de atividade intracelular, o valor obtido é ainda 2,8 vezes superior, evidenciando a vantagem do uso da fração extracelular.

A presença de atividade lipolítica extracelular confirma que *E. coli* é capaz de reconhecer a sequência do peptídeo sinal de *Burkholderia*. A capacidade de secreção da lipase evidencia uma conveniência tecnológica, já que a recuperação de uma proteína extracelular demanda um processo mais simples e de menor custo que a obtenção de proteínas intracelulares.

Estudos relatam a dificuldade de *E. coli* em secretar grandes quantidades de proteína para o meio extracelular, podendo estas se agregar em corpos de inclusão (Slouka et al., 2018). O uso de baixas temperaturas na etapa de indução pode auxiliar em um melhor processamento da produção da proteína superexpressa, reduzindo a formação dos corpos de inclusão. A análise por SDS-PAGE (Figura VII.11) evidencia que a indução em baixas temperaturas foi vantajosa para menor formação de corpos de inclusão e um melhor processamento e secreção da lipase.

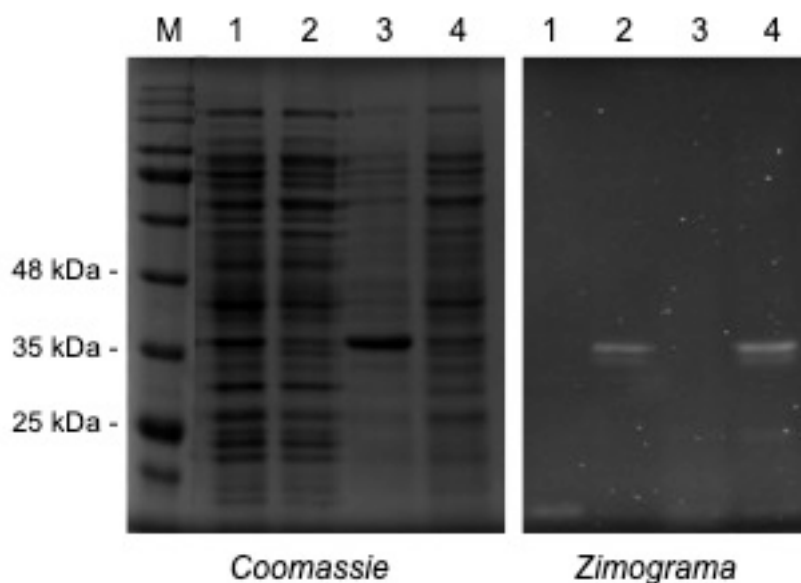


Figura VII.11. Indução da produção da lipase em meio LB a 18 °C. M: marcador de massa molecular; 1: fração intracelular (pET21a+); 2: fração intracelular (pET-LIP-LIF); 3: fração extracelular (pET21a+); 4: fração extracelular (pET-LIP-LIF).

A análise em gel evidenciou ainda, que, apesar de estar sendo capaz de secretar para o meio extracelular, a lipase não é observada com uma banda muito intensa de proteína, como esperado para proteínas superexpressas. De todo modo, a otimização da produção foi seguida por uma etapa de avaliação da indução com diferentes temperaturas e menor quantidade de IPTG. Assim, após 20 h de indução com IPTG $0,55 \text{ mmol.L}^{-1}$, foram encontradas atividades lipolíticas extracelulares de $71,3 \pm 1,8$; $6,9 \pm 0,4$ e $17,1 \pm 1,0 \text{ U.mg}^{-1}$ para cultivos em meio LB com indução a 15, 26 e 37 °C, respectivamente. Desta forma, fica evidente o impacto significativo da alteração da concentração do indutor em combinação com a temperatura sobre a produção da lipase. Segundo Akbari e colaboradores (2015), a alta concentração de IPTG pode levar a uma maior produção de proteases bacterianas e a uma taxa de crescimento significativamente reduzida, prejudicando a produção da proteína de interesse. Além do mais, considerando o alto custo e potencial toxicidade do IPTG, já que este não é metabolizado pela *E. coli*, a determinação da concentração ótima desse indutor é de importância fundamental.

4. Conclusões

A lipase BGL de *Burkholderia gladioli* BRM58833 foi eficientemente produzida utilizando *Escherichia coli* como sistema de expressão. A coexpressão dos genes *LIP* e *LIF* demonstrou ser essencial para a obtenção de uma lipase expressa em sua forma ativa, corroborando evidências apresentadas na literatura para outras espécies de *Burkholderia* e *Pseudomonas*. Após um estudo das condições de cultivo e indução para obtenção da lipase recombinante, encontrou-se uma atividade lipolítica de $71,3 \pm 1,8 \text{ U.mg}^{-1}$ para o cultivo em meio LB quando induzida com IPTG $0,55 \text{ mmol.L}^{-1}$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 h. A atividade lipolítica foi observada para a fração extracelular, representando uma vantagem tecnológica para recuperação e aproveitamento da enzima com menor necessidade de manipulação do material e menores custos associados. Novos estudos ainda se fazem necessários para a obtenção de maiores quantidades de proteína bem como da sua purificação e caracterização bioquímica para comparação com a enzima nativa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente trabalho avaliou a atividade enzimática de extratos obtidos do cultivo de microrganismos associados ao dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.), revelando o grande potencial biotecnológico da diversidade microbiológica do cerrado brasileiro. Com este estudo contribuímos para a formação da coleção de microrganismos e microalgas aplicados à agroenergia e biorrefinarias (CMMAABio), disponibilizando microrganismos e informações para novos estudos que poderão aprofundar-se em outras aplicações biotecnológicas de interesse dos grupos de pesquisa envolvidos. Em especial, destacou-se o estudo das lipases microbianas secretadas por dois microrganismos quando cultivados por fermentação em estado sólido: o fungo filamentoso *Aspergillus* sp. e a bactéria *Burkholderia gladioli* BRM58833. A produção destas enzimas foi otimizada e seu potencial catalítico explorado para a produção de biodiesel e de nutracêuticos enriquecidos em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3. Assim, os resultados aqui apresentados contribuem para um aprofundamento da biologia dos microrganismos envolvidos e também para a aplicação das lipases estudadas, somando ao conhecimento gerado por diversos grupos de pesquisa no Brasil e no exterior.

Dentre as inovações propostas por este trabalho destacam-se: i) primeiro estudo a avaliar e explorar o potencial de microrganismos produtores de lipase associados ao dendezeiro; ii) primeiro estudo de fermentação em estado sólido utilizando *Burkholderia gladioli*; iii) a combinação de estratégias metodológicas para otimização da síntese de ésteres etílicos; iv) a construção de uma camada bifuncional com função estabilizadora de derivados imobilizados com revestimento combinado de NH₂-PEG e glicina; e v) primeiro estudo de expressão heteróloga da lipase de *Burkholderia gladioli* e demonstração da dependência da co-expressão de sua foldase específica como demonstrado para outras espécies do gênero *Burkholderia* na literatura.

As seguintes perspectivas permanecem em aberto e poderão ser alvo de novos estudos:

- Caracterização da lipase de *Aspergillus* sp. BDA-FI 7 e estudos de aplicação para a síntese de biodiesel;
- Realização de um estudo comparativo das lipases fúngicas e bacterianas obtidas, bem como da combinação destas para formação de coquetéis enzimáticos;
- Investigação da utilização dos SFL obtidos do cultivo de *Burkholderia gladioli* BRM58833 em reações de transesterificação de óleos vegetais em reator de leito fixo a fim de buscar maiores teores de ésteres etílicos;
- Estudos de diferentes aplicações industriais da enzima purificada BGL;
- Otimização da produção de DHA com o uso dos derivados imobilizados obtidos;
- Otimização da produção da lipase recombinante, purificação e caracterização bioquímica para comparação entre as formas nativa e recombinante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLMALEKI, F.; KOVANEN, P. T.; MARDANI, R.; HAYAT, S. M. G.; BO, S.; SAHEBKAR, A. Resolvins: emerging players in autoimmune and inflammatory diseases. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**. v. 58, p. 82-91. 2020.

ADRIO, J. L.; DEMAÏN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**. v. 4, p. 117-139. 2014.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67. 2015.

AKBARI, V.; SADEGHI, H. M. M.; DEHKORDI, A. J.; CHOU, C. P.; ABEDI, D. Optimization of a single-chain antibody fragment overexpression in *Escherichia coli* using response surface methodology. **Research in Pharmaceutical Sciences**. v. 10, n. 1, p. 75-83. 2015.

ALBERTON, D. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido visando à aplicação no tratamento de efluente de laticínios**. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências: Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ALBERTON, D.; MITCHELL, D. A.; CORDOVA, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; KRIEGER, N. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. **Food Technology and Biotechnology**. v. 48, n. 1, p. 28-35. 2010.

ALEXANDRE, V. M. F.; VALENTE, A. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy**. v. 36, n. 12, p. 3439-3444. 2011.

ALKAN, H.; BAYSAL, Z.; UYAR, F.; DOĞRU, M. Production of a lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136, n. 1, p. 183-192. 2007.

AMIN, F.; BHATTI, H. N.; REHMAN, S. Optimization of growth parameters for lipase production by *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 28, p. 5514-5523. 2011.

AMIN, F.; BHATTI, H. N. Effect of physicochemical parameters on lipase production by *Penicillium fellutanum* using canola seed oil cake as substrate. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 16, n. 1, p. 118-124. 2014.

AOUF, C.; DURAND, E.; LECOMTE, J.; FIGUEROA-ESPINOZA, M. C.; DUBREUCQ, E.; FULCRAND, H.; VILLENEUVE, P. The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. **Green Chemistry**. v. 16, p. 1740-1754. 2014.

ARPIGNY, J. L., & JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochemical Journal**, v. 343, n. 1, p. 177-183. 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15764: Biodiesel – determinação do teor total de ésteres por cromatografia gasosa**, p. 13. 2015.

de AZEREDO, L. A. I.; GOMES, P. M.; SANT'ANNA JR, G. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Production and regulation of lipase activity from *Penicillium restrictum* in submerged and solid-state fermentation. **Current Microbiology**. v. 54, n. 5, p. 361-365. 2007.

BAKAR, N. A.; ABD-AZIZ, S.; HASSAN, M. A.; GHAZALI, F. M. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. **Biotechnology**. v. 9, n. 1, p. 73-78. 2010.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J.M. A single-step purification, immobilization and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 58, n. 5, p. 486-493. 1998.

BCC RESEARCH. Global lipase market. **Market Research Report (VMR051A)**, dezembro de 2018. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/partners/verified-market-research/global-lipase-market.html>>. Acesso em: 9 de abr. 2021.

BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 102, n. 2, p. 133-153. 2000.

BELTZ, B. S.; TLUSTY, M. F.; BENTON, J. L.; SANDEMAN, D. C. Omega-3 fatty acids upregulate adult neurogenesis. **Neuroscience Letters**. v. 415, p. 154-158. 2007.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid-state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**. v. 44, n. 2, p. 213-221. 2001.

BHARGAV, S.; PANDA, B. P.; ALI, M.; JAVED, S. Solid-state fermentation: an overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. v. 22, n. 1, p. 49-70. 2008.

BHATTI, H. N.; AMIN, F. Kinetic and hydrolytic characterization of newly isolated alkaline lipase from *Ganoderma lucidum* using canola oil cake as substrate. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**. v. 35, n. 3, p. 585-592. 2013.

BIVI, M. R.; FARHANA, M. S. N.; KHAIRULMAZMI, A.; IDRIS, A. Controlo f *Ganoderma boninense*: a causal agente of basal stem rot disease in oil palm with endophyte bactéria *in vitro*. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 12, n. 6, p. 833-839. 2010.

BRASIL. **Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016**. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. Diário Oficial da república Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 mar. 2016. Disponível em: <http://www.in.gov.br>. Acesso em: 15 jan. 2019.

BRASIL. Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). **Resolução nº 16, de 29 de outubro de 2018**. Dispõe sobre a evolução da adição obrigatória de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final, em qualquer parte do território nacional. Diário Oficial da república Federativa do Brasil. Brasília, DF, 8 nov. 2018. Disponível em: <http://www.in.gov.br>. Acesso em: 11 mai. 2021.

BOLÍVAR, J. M.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; GODOY, C.; RODRIGUES, D. S.; RODRIGUES, R. C.; BATALLA, P.; ROCHA-MARTÍN, J.; MATEO, C.; GIORDANO, R. L. C.; GUISÁN, J. M. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: new strategies of immobilization by multipoint covalente attachment. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 45, p. 477-483. 2009.

BORKAR, P. S.; BODADE, R. G.; RAO, S. R.; KHOBRADE, C. N. Purification and characterization of extracelular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 140, p. 358-366. 2009.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**. v. 13, p. 1-45. 1951.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: design, innovation and discovery**. 2. ed. New York, NY: John Wiley & Sons, 1978, 655 p.

CABRERA, Z.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very diferente selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 57, p. 171-176. 2009.

CAPELLA-GUTIERREZ, S; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**. v. 25, p. 1972–1973. 2009.

CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**. v. 32, n. 1, p. 175-187. 2009.

CARR, P. D.; OLLIS, D. L. α/β -hydrolase fold: an update. **Protein & Peptide Letters**. v. 16, p. 1137-1148. 2009.

CARTER, C.; FINLEY, W.; FRY, J.; JACKSON, D.; WILLIS, L. Palm oil markets and future supply. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 109, n. 4, p. 307-314. 2007.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; FREGOLENTE, P. B. L.; FREGOLENTE, L. V. Enzymatic hydrolysis of salmon oil by native lipases: optimization of process parameters. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 1, p. 117-124. 2009.

CARVALHO, M. S.; MENDONÇA, M. A.; PINHO, D. M.; RESCK, I. S.; SUAREZ, P. A. Chromatographic analyses of fatty acid methyl esters by HPLC-UV and GC-FID. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 763-769. 2012.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. v. 4, n. 3, p. 239-247. 2000.

CAVALCANTI, E. A. C.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R.; SANT'ANNA JR, G. L. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, p. 79-84. 2005.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques and outlooks. **Catalysts**. v. 8, 238. 2018.

CHEETAM, P.S.J. Removal of Triton X-100 from aqueous solution using Amberlite XAD-2. **Analytical Biochemistry**. v 92, p 447-452. 1979.

CHEN, L.; KONG, X.; LIANG, Z.; YE, F.; YU, K.; DAI, W.; WU, D.; LUO, C.; JIANG, H. Theoretical study of the mechanism of proton transfer in the esterase EstB from *Burkholderia gladioli*. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 115, p. 131019-13025. 2011.

CHRISTAKOPOULOS, P.; TZALAS, B.; MAMMA, D.; STAMATIS, H.; LIADAKIS, G. N.; TZIA, C.; KEKOS, D.; KOLISIS, F. N.; MACRIS, B. J. Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reactions in organic solvents. **Process Biochemistry**. v. 33, n. 7, p. 729-733. 1998.

CHRISTEN, P.; ANGELES, N.; CORZO, G.; FARRER, A.; REVAH, S. Microbial lipase production on a polymeric resin. **Biotechnology Techniques**. v. 9, n. 8, p. 597-600. 1995.

CIUDAD, G.; REYES, I.; AZÓCAR, L.; BRIONES, R.; JORQUERA, M.; WICK, L. Y.; NAVIA, R. Innovative approaches for effective selection of lipase-producing microorganisms as whole cell catalysts for biodiesel production. **New Biotechnology**. v. 28, n. 4, p. 375-381. 2011.

COLLINS, T.; AZEVEDO-SILVA, J.; COSTA, A.; BRANCA, F.; MACHADO, R.; CASAL, M. Batch production of a silk-elastin-like protein in *E. coli* BL21(DE3): key parameters for optimization. **Microbial Cell Factories**. v. 12, 21. 2013.

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

CUNHA, A. G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUTARRA, M. L. E.; BEVILAQUA, J. V.; ALMEIDA, R. V.; PAIVA, L. M. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; FREIRE, D. M. G. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 156, n. 1-3, p. 563-575. 2009.

DAIHA, K. G.; BRÊDA, G. C.; LARENTIS, A. L.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Enzyme technology in Brazil: trade balance and research community. **Brazilian Journal of Science and Technology**. v. 3, 17. 2016.

DALAL, S.; SINGH, P. K.; RAGHAVA, S.; RAWAT, S.; GUPTA, M. N. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 51, n. 1, p. 23-31. 2008.

DAMASCENO, F. R. C.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Impacto of the addition of an enzyme pool on an activated sludge system treating dairy wastewater under fat shock loads. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 83, n. 5, p. 730-738. 2008.

DAMASCENO, F. R. C.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. The combined use of a biosurfactant and an enzyme preparation to treat an effluent with a high fat content. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 95, p. 241-246. 2012.

DAMASO, M. C. T.; SALUM, T. F. C.; TERZI, S. C.; COURI, S. Assay methods for lipase activity. In: VERMELHO, A. B.; COURI, S. (Ed.). **Methods to determine enzymatic activity**. Rio de Janeiro, RJ: Bentham Science, 2013, p. 161-194.

DAYANANDAN, A.; RANI, S. H. V.; SHANMUGAVEL, M.; GNANAMANI, A.; RAJAKUMAR, G. S. Enhanced production of *Aspergillus tamaritii* lipase for recovery of fat from tannery fleshings. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 4, p. 1089-1095. 2013.

DEMERA, L. L.; BARAHONA, P. P.; BARRIGA, E. J. C. Production, extraction and characterization of lipases from the Antarctic Yeast *Guehomyces pullulans*. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 15, p. 75-82. 2019.

DEMIRDAG, T. B.; PARLAKAY, A. O.; AYGAR, I. S.; GULHAN, B.; YUKSEK, S. K. Major aspects of *Burkholderia gladioli* and *Burkholderia cepacia* infections in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 39, n. 5, p. 374-378. 2020.

DI LUCCIO, M.; CAPRA, F.; RIBEIRO, N. P.; VARGAS, G. D. L. P.; FREIRE, D. M. G.; OLIVEIRA, D. Effect of temperature, moisture and carbon supplementation on lipase production by solid state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, p. 173-180. 2004.

DI RUSSO, N. V.; ESTRIN, D. A.; MARTÍ, M. A.; ROITBERG, A. E. pH dependent conformational changes in proteins and their effect on experimental pK_as: the case of nitrophenol 4. **PLOS Computational Biology**. v. 8, n. 11, e1002761. 2012.

DIAZ, P.; PRIM, N.; PASTOR, F. I. J. Direct fluorescent-based lipase activity assay. **BioTechniques**. v. 27, p. 696-700. 1999.

DIAZ, J. C. M.; RODRIGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1042-1050. 2006.

DOMÍNGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid state culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1225-1229. 2003.

EGGINS, H. O. W. The isolation of fungi causing deterioration in Nigerian palm oil. **Mycopathologia et mycologia applicata**. v. 22, n. 2, p. 201-213. 1964.

EL KHATTABI, M., VAN GELDER, P., BITTER, W., & TOMMASSEN, J. Role of the calcium ion and the disulfide bond in the *Burkholderia glumae* lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 329-338. 2003.

ESAKKIRAJ, P.; USHA, R.; PALAVESAM, A.; IMMANUEL, G. Solid-state production of esterase using fish processing wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU. **Food and Bioproducts Processing**. v. 90, n. 3, p. 370-376. 2012.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. U.S. Department of Energy. National Renewable Energy Laboratory. **Biodiesel Handling and Use Guide (4th ed.)**. Golden, CO, 2008. Disponível em: <http://www.nrel.gov>. Acesso em: 16 jan. 2019.

FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. L. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**. v. 44, n. 2, p. 235-240. 2006.

FANKEM, H.; NWAGA, D.; DEUBEL, A.; DIENG, L.; MERBACH, W.; ETOA, F. X. Occurrence and functioning of phosphatase solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, n. 24, p. 2450-2460. 2006.

FERNANDES, M. L. M.; SAAD, E. B.; MEIRA, J. A.; RAMOS, L. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 44, n. 1, p. 8-13. 2007.

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

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; RODRÍGUEZ, V.; MATEO, C.; PENZOL, G.; HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA, F.; GUISÁN, J. M. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques, **Journal of Molecular Catalysis B**. v. 7, p. 181-189. 1999.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PIZARRO, C.; LÓPEZ-VELA, D.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; PESSELA, B.; GUISÁN, J. M. Hydrolysis of fish oil by lipases immobilized inside porous supports. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 88, p. 819-826. 2011.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISAN, J. M. Release of omega-3 fatty acids by the hydrolysis of fish oil catalyzed by lipases immobilized on hydrophobic supports. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 88, p. 1173-1178. 2011b.

FRAGA, L. P.; CARVALHO, P. O.; MACEDO, G. A. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* on brazilian agricultural by-products and its enantioselective properties. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, n. 1, p. 138-146. 2012.

GAGIC, D.; CIRIC, M.; WEN, W. X.; NG, F.; RAKONJAC, J. Exploring the secretomes of microbes and microbial communities using filamentous phage display. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 429. 2016.

GALEANO, J. D.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Biodiesel production by solvent-free ethanolysis of palm oil catalyzed by fermented solids containing lipases of *Burkholderia contaminans*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 127, p. 77-86. 2017.

GAMMONE, M. A.; RICCIONI, G.; PARRINELLO, G.; D'ORAZIO, N. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: benefits and endpoints in sport. **Nutrients**. v. 11, 46. 2019.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. Use of a low-cost methodology for

biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, n. 5, p. 317-322. 2009.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; CASTRO, A.M.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D.M.G. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945-953. 2011.

GOMBERT, A. K.; PINTO, A. L.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**. v. 35, n. 1-2, p.85-90. 1999.

GREEN, E. R.; MECSAS, J. Bacterial secretion systems – an overview. **Microbiology Spectrum**. v. 4, n. 1. 2016.

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

GUISAN, J. M.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; HALLING, P. J.; KENNEDY, D.; MIYATA, E.; RE, D. Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 11, p. 817-824. 2001.

GUTARRA, M. L. E.; CAVALCANTI, E. D. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Lipase production by solid state fermentation: cultivation conditions and operation of tray and packed-bed bioreactors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 121, n. 1-3, p. 105-116. 2005.

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Biology Technology and Biotechnology**. v. 82, p.313-318. 2007.

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**. v. 100, n. 21, p. 5249-5254. 2009.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York, NY: Marcel Dekker Inc., 1989, 284 p.

HELISTÖ, P.; KORPELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 23, n. 1-2, p. 113-117. 1998.

HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, B. CÓRDOVA, J.; BÁRZANA, E.; FAVELA-TORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by

thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 61, n. 3-4, p. 136-142. 2009.

HOBSON, A. H.; BUCKLEY, C. M.; AAMAND, J. L.; JØRGENSEN, S. T.; DIDERICHSEN, B.; McCONNELL, D. J. Activation of a bacterial lipase by its chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 12, p. 5682-5686. 1993.

HOLČAPEK, M.; JANDERA, P.; FISCHER, J.; PROKEŠ, B. Analytical monitoring of the production of biodiesel by high-performance liquid chromatography with various detection methods. **Journal of Chromatography A**. v. 858, p. 13-31. 1999.

HOLLAND, R.; LIU, S. Q.; CROW, V. L.; DELABRE, M. L.; LUBBERS, M.; BENNETT, M.; NORRIS, G. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. **International Dairy Journal**. v. 15, p. 711-718. 2005.

HOLLOWAY, P.W. A simple procedure for removal of Triton X-100 from protein samples. **Analytical Biochemistry**. v 53, p 304-308. 1973.

HONGWEI, Y.; JINCHUAN, W.; BUN, C. C. Kinetic resolution of ibuprofen catalyzed by *Candida rugosa* lipase in ionic liquids. **Chirality**. v. 17, p. 16-21. 2005.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 118, p. 155-170. 2004.

HUVET, M.; STUMPF, M. P. H. Overlapping genes: a window on gene evolvability. **BMC Genomics**. v. 15, n. 1, 721. 2014.

IMANDI, S. B.; KARANAM, S. K.; GARAPATI, H. R. Use of Plackett-Burman design for rapid screening of nitrogen and carbon sources for the production of lipase in solid state fermentation by *Yarrowia lipolytica* from mustard oil cake (*Brassica napus*). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 915-921. 2013.

IVANCIC, M.; VALINGER, G.; GRUBER, K.; SCHWAB, H. Inverting enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* esterase EstB by directed and designed evolution. **Journal of Biotechnology**. v. 129, p. 109-122. 2007.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351. 1999.

JAEGER, K. E., & EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390-397. 2002.

JAHANGIRI, A.; MØLLER, A. H.; DANIELSEN, M.; MADSEN, B.; JOERNSGAARD, B.; VAERBAK, S.; ADLERCREUTZ, P.; DALSGAARD, T. K. Hydrophilization of bixin by lipase-catalyzed tranesterification with sorbitol. **Food Chemistry**. v. 268, p. 203-209. 2018.

JEGANNATHAN, K. R.; ENG-SENG, C.; RAVINDRA, P. Economic assessment of biodiesel production: comparison of álcali and biocatalyst processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 15, p. 745-751. 2011.

JENSEN, R. G. Characteristics of the lipase from the mold *Geotrichum candidum*: a review. **Lipids**. v. 9, n. 3, p. 149-157. 1974.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**. v. 20, p. 801-821. 2014.

JOHNSON, Z. I.; CHRISHOLM, S. W. Properties of overlapped genes are conserved across microbial genomes. **Genome Research**. v. 14, n. 11, p. 2268-2272. 2004.

JONES, L. H.; HUGHES, W. A. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: BAJAJ, Y. P. S. (Ed.) **Biotechnology in Agriculture and Forestry 5: Trees II**. Berlin: Springer-Verlag, 1989, p. 176-202.

JØRGENSEN, S.; SKOV, K. W.; DIDERICHSEN, B. Cloning, sequence and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. **Journal of Bacteriology**. v. 173, n. 2, p. 559-567. 1991.

KABEYA, N.; FONSECA, M. M.; FERRIER, D. E. K.; NAVARRO, J. C.; BAY, L. K.; FRANCIS, D. S.; TOCHER, D. R.; CASTRO, L. F. C.; MONROIG, O. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. **Science Advances**. v. 4, eaar6849. 2018.

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S.; PUVANAKRISHNAN, R. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**. v. 33, n. 5, p. 505-511. 1998.

KAPILAN, R. Solid state fermentation for microbial products: a review. **Archives of Applied Science Research**. v. 7, n. 8, p. 21-25. 2015.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 555-569. 2012.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. **Molecular Biology and Evolution**. v. 30, p. 772-780. 2013.

KHORAMNIA, A.; EBRAHIMPOUR, A.; BEH, B. K.; LAI, O. M. Production of a solvent, detergent and thermotolerant lipase by a newly isolated *Acinetobacter* sp. In submerged and solid-state fermentations. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. ID 702179. 2011.

KOTOGÁN, A.; NÉMETH, B.; VÁGVÖLGYI, C.; PAPP, T.; TAKÓ, M. Screening for extracellular lipase enzymes with transesterification capacity in *Mucoromycotina* strains. **Food Technology and Biotechnology**. v. 52, n. 1, p. 73-82. 2014.

KOUKER, G. & JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied Environmental Microbiology**. v. 53, p. 211–213. 1987.

KOVACIC, F.; BABIC, N.; KRAUSS, U.; JAEGER, K. E. Classification of lipolytic enzymes from Bacteria. In: ROJO, F. (ed.) Aerobic utilization of hydrocarbons, oils and lipids. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin: Springer Cham, 2019. p 1-35.

KUHN, G.; MARANGONI, M.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, V. F.; GODOY, M. G.; CASTRO, A. M.; LUCCIO, M. D.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Esterification activities of non-commercial lipases after pre-treatment in pressurized propane. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 85, n. 6, p. 839-844. 2010.

KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, S. K.; NEGI, S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**. v. 120, p. 300-304. 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, n. 5259, p. 680-685. 1970.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: STACKEBRANDT, E. and GOODFELLOW, M. (Eds.) **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic**. New York: John Wiley and Sons, 1991, p. 115-175.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 19, n. 2, p. 175-180. 2002.

LECHNER, M.; FINDEIß, S.; STEINER, L.; MARZ, M.; STADLER, P. F.; PROHASKA, S. J. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. **BMC Bioinformatics** v. 12, p. 124. 2011.

LEE, S. Y. & RHEE, J. S. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 15, p. 617–24. 1993.

LESUISSE, E.; SCHANK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemistry**. v. 216, p. 155-160. 1993.

LI, F. H.; SUN, X. D.; NIU, X. Q.; CAO, H. X.; YU, F. Y. First report of basal stem rot on oil palm caused by *Thielaviopsis paradoxa* in Hainan, China. **Plant Disease**. v. 102, n. 10, p. 2029. 2018.

LIEW, P. W. Y.; JONG, B. C.; GOH, C. M.; AHMAD, M. Bacterial diversity associated with empty oil palm fruit bunch compost as revealed by cultivation-independent analyses of PCR amplified 16S rRNA genes. **Journal of General and Applied Microbiology**. v. 55, p. 233-240. 2009.

LIU, Y.; LI, C.; MENG, X.; YAN, Y. Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. **Fuel Processing Technology**. v. 106, p. 303-309. 2013.

LIU, Y.; LI, C.; WANG, S.; CHEN, W. Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. **Applied Energy**. v. 113, p. 713-721. 2014.

LOPEZ, D.; DEIVE, F. J.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, M. A. Strategies for utilization of food-processing wastes to produce lipases in solid state cultures of *Rhizopus oryzae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 33, n. 8, p. 929-935. 2010.

LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ROCHA-MARTIN, J.; BOLIVAR, J. M.; MATEO, C.; GUIBAN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent immobilization on supports activated with glyoxyl groups, in: GUIBAN, J. M. (Ed.) **Immobilization of Enzymes and Cells**, Springer, 2013. p. 59-72.

LUO, Y.; BATTISTUZZI, F.; LIN, K. Evolutionary dynamics of overlapped genes in *Salmonella*. **PLOS One**. v. 8, n. 11, e81016. 2013.

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 118, p. 334-340. 2009.

MACIEL, V. F. A., PACHECO, T. F. & GONÇALVES, B. L. **Padronização do uso de corante rodamina B para avaliação de atividade lipolítica em estirpes fúngicas**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2011. 4p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 05).

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**. v. 38, n. 5, p. 715-721. 2002.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**. v. 99, n. 6, p. 1729-1735. 2008.

MAHAPATRA, P.; KUMARI, A.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R.; NAG, A. Optimization of process variables for lipase biosynthesis from *Rhizopus oligosporus* nrri 5905 using evolutionary operation factorial design technique. **Indian Journal of Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 396-403. 2010.

MALILAS, W.; KANG, S. W.; KIM, S. B.; YOO, H. Y.; CHULALAKSANANUKUL, W.; KIM, S. W. Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268: Optimization of solid state fermentation and application to biodiesel production. **Korean Journal of Chemical Engineering**. v. 30, n. 2, p. 405-412. 2013.

MANDARINO, J. M. G.; HIRAKURI, M. H.; ROESSING, A. C. Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos 2 ed. **Documentos/Embrapa Soja**, ISSN 2176-2937, n. 171. p. 41. 2015.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 71, p. 53-57. 2015.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; GARCIA, H. S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELATORRES, E. Organic phase synthesis of ethyl oleate using lipases produced by solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 151, n. 2-3, p. 393-401. 2008.

MARTINS, P. A.; PACHECO, T. F.; CAMARGO, B. R.; DE MARCO, J. L.; SALUM, T. F. C. Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. v. 51, p. 1-10. 2021.

MATEO, C.; GRAZU, V.; PALOMO, J. M.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. **Nature Protocols**. v.2, n. 5, p.1022-1033. 2007.

MATUOOG, N.; LI, K.; YAN, Y. *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on magnetic nanoparticles and its application in the hydrolysis of fish oil. **Journal of Food Biochemistry**. e12549. 2018.

MEGHWANSHI, G. K.; AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 40, p. 127-131. 2006.

MOFTAH, O.A.S.; GRBAVČIĆ, S.; ŽUŽA, M.; LUKOVIĆ, N.; BEZBRADICA, D.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: production of lipase and protease by *Candida utilis* in solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 348-364. 2012.

MOFTAH, O. A. S.; GRBAVČIĆ, S.; MOFTAH, W. A. S.; LUKOVIĆ, N.; PRODANOVIĆ, O. L.; JAKOVETIĆ, S. M.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Lipase production

by *Yarrowia lipolytica* using olive oil processing wastes as substrates. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 6, p. 781-794. 2013.

MORAIS JÚNIOR, W.G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; RIBEIRO, E. J.; RESENDE, M. M.; PESSELA, B. C. Production of ω -3 polyunsaturated fatty acids through hydrolysis of fish oil by *Candida rugosa* lipase immobilized and stabilized on diferente supports. **Biocatalysis and Biotransformation**. v. 35, n. 1, p. 63-73. 2017.

MORAIS JÚNIOR, W.G.; MAIA, A. M.; MARTINS, P. A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; PESSELA, B. C. Influence of different immobilization techniques to improve the enantioselectivity of lipase from *Geotrichum candidum* applied on the resolution of mandelic acid. **Molecular Catalysis: A**. v. 458, p. 89-96. 2018.

MORENO-PEREZ, S.; ORREGO, A. H.; ROMERO-FERNANDEZ, M.; TROBOMASEDA, L.; MARTINS-DeOLIVEIRA, S.; MUNILLA, R.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. Intense PEGylation of enzyme surfaces: relevant stasbilizing effects. In: KUMAR, C. V. (Ed.) **Methods in Enzymology: rational design of enzyme-nanomaterials**. Elsevier, 2016. p. 55-72.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 58, n. 20, p. 2047-2067. 2011.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2. Ed. New York, NY: Wiley, 2002, 856 p.

NAGY, V.; TÓKE, E. R.; KEONG, L. C.; SZATZKER, G.; IBRAHIM, D.; OMAR, I. C.; SZACÁCS, G.; POPPE, L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enymatic**. v. 39, n. 1-4, p. 141-148. 2006.

OGINO, H.; INOUE, S.; YASUDA, M.; DOUKYU, N. Hyper-activation of foldase-dependent lipase with lipase-specific foldase. **Journal of Biotechnology**. v. 166, p. 20-24. 2013.

OKADA, T.; MORRISSEY, M. T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. **Food Chemistry**. v. 103, p. 1411-1419. 2007.

OLIVEIRA, B. H.; CORADI, G. V.; ATTILI-ANGELIS, D.; SCAURI, C.; LUQUES, A. H. P. G.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; NETO, P. O.; LIMA, V. M. G. Comparison of lipase production on crambe oil and meal by *Fusarium sp. (Gibberella fujikuroi* complex). **European Journal of Lipid Science and Technology**. v. 115, n. 12, p. 1413-1425. 2013.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, E.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S. M.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H. G.; GOLDMAN, A. The α/β -hydrolase fold. **Protein Engineering**. v, 5, n. 3, p. 197-211. 1992.

OLUSESAN, A. T.; AZURA, L. K.; FORGHANI, B.; BAKAR, F. A.; MOHAMED, A. K. S.; RADU, S.; MANAP, M. Y. A.; SAARI, N. Purification, characterization and thermal inactivation kinetics of a non-regioselective thermostable lipase from a genotypically identified extremophilic *Bacillus subtilis* NS 8. **New Biotechnology**. v. 28, p. 738–745. 2011.

ONU. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Oil Palm Fruit Production Quantity**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 20/01/2019.

ORREGO, A. H.; GHOBADI, R.; MORENO-PEREZ, S.; MENDOZA, A. J.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Stabilization of immobilized lipases by intense intramolecular cross-linking of their surfaces by using aldehyde-dextran polymers. **International Journal of Molecular Science**. v. 19, p. 553. 2018.

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; DOS SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; MURCIA, A. B.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science and Technology**. v. 9, p. 2380-2420. 2019.

PALMA, M. B.; PINTO, A. L.; GOMBERT, A. K.; SEITZ, K. H.; KIVATINITZ, S. C.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Lipase production by *Penicillium restrictum* using solid waste of industrial babassu oil production as substrate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84-86, p. 1137-1145. 2000.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 19-20, p. 279-286. 2002.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCCOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. v. 29, n. 2, p. 119-131. 1999.

PANSE, M. L.; PHALKE, S. D. Fortification of food with omega-3 fatty acids. In: HEDGE, M.; ZANWAR, A.; ADEKAR, S. (Ed.). **Omega-3 fatty acids**. Berlin: Springer Cham, 2016. p. 89-100.

PEIRCE, S.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; RUSSO, M. E.; MARZOCHELLA, A.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of *Candida Antarctica* lipase B (CALB) immobilized on octyl agarose bby treatment with polyethyleneimine (PEI). **Molecules**. v. 21, 751. 2016.

PERERA, S. A. C. N. Oil palm and coconut. In: PRATAP, A; KUMAR, J. (Eds.) **Alien gene transfer in crop plants, Volume 2: achievements and impacts**. Berlin: Springer, 2014, p. 231-252.

PETERSEN, M. T. N.; FOJAN, P.; PETERSEN, S. B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. **Journal of Biotechnology**. v. 85, n. 2, p. 115-147. 2001.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 93, p. 67-80. 1998.

PONG, V. M.; ZAINAL ABIDIN, M. A.; ALMALIKY, B. S. A.; KADIR, J.; WONG, M. Y. Isolation, fruiting and pathogenicity of *Marasmiellus palmivorus* (Sharples) Desjardin (comb. prov.) in oil palm plantations in west Malaysia. **Tropical Agricultural Science**. v. 35, n. S, p. 37-48. 2012.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: presente status and future prospects. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 511-525. 2015.

PRASETYO, A. E.; LOPEZ, J. A.; ELDRIDGE, J. R.; ZOMMICK, D. H.; SUSANTO, A. Long-term studying of *Bacillus thuringiensis* application to control *Tirathaba rufivena*, along with the impact to *Elaeidobius kamerunicus*, insect biodiversity and oil palm productivity. **Journal of Oil Palm Research**. v. 30, n. 1, p. 71-82. 2018.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 -- Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, e9490. 2010.

PRIM, N.; SÁNCHEZ, M.; RUIZ, C.; PASTOR, F. I. J.; DÍAZ, P. Use of methylumbeliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 22, p. 339-346. 2003.

RAJAN, A; NAIR, A. J. A comparative study on alkaline lipase production by a newly isolated *Aspergillus fumigatus* MTCC 9657 in submerged and solid-state fermentation using economically and industrially feasible substrate. **Turkish Journal of Biology**. v. 35, p. 569-574. 2011.

RAMÍREZ, L.; ARRIZON, J.; SANDOVAL, G.; CARDADOR, A.; BELLO-MENDOZA, R.; LAPPE, P.; MATEOS-DÍAS, J. C. A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases and

chlorogenate esterases. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 151, n. 2-3, p. 711-723. 2008.

REDONDO, O.; HERRERO, A.; BELLO, J. F.; ROIG, M. G.; CALVO, M. V.; PLOU, F. J.; BURGUILLO, F. J. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1243, n. 1, p. 15-24. 1995.

REHMAN, S.; BHATTI, H. N.; BHATTI, I. A.; ASGHER, M. Optimization of process parameters for enhanced production of lipase by *Penicillium notatum* using agricultural wastes. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 84, p. 19580-19589. 2011.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P. OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. D. Application of diferente lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. **Environmental Engineering Science**. v. 25, n. 9, p. 1243-1248. 2008a.

RIGO, E.; RIGONI, R. E.; LODEA, P. OLIVEIRA, D.; FREIRE, D. M. G.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. Comparison of two lipases in the hydrolysis of oil and grease in wastewater of the swine meat industry. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. v. 47, n. 6, p. 1760-1765. 2008b.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with diferente supplements. **LWT – Food Science and Technology**. v. 43, n. 7, p. 1132-1137. 2010.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; REMONATTO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. D. Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. **Food and Bioprocess Technology**. v. 5, n. 5, p. 1592-1600. 2012.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTIZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-MURCIA, A.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems and solutions. **Biotechnology Advances**. v. 37, p. 746-770. 2019.

ROMERO-FERNANDEZ, M.; MORENO-PEREZ, S.; DE OLIVEIRA, S. M.; SANTAMARÍA, R. I.; GUISAN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Preparation of a robust immobilized biocatalyst of β -1,4-endoxylanase by surface coating with polymers for production of xylooligosaccharides from different xylan sources. **New Biotechnology**. v. 44, p. 50-58. 2018.

ROSA, D. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a novel solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**. v. 23, n. 5, p. 814-823. 2006.

ROSA, D. R.; DUARTE, I. C. S.; SAAVEDRA, N. K.; VARESCHE, M. B.; ZAIAT, M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance and molecular evaluation of anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 24, p. 6170-6176. 2009.

ROSENAU, F., TOMMASSEN, J., & JAEGER, K. E. Lipase-specific foldases. **Chembiochem**, v. 5, n. 2, p. 152-161. 2004.

SAHOO, R. K.; SUBUDHI, E.; KUMAR, M. Quantitative approach to track lipase producing *Pseudomonas* sp. S1 in nonsterilized solid state fermentation. **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, n. 6, p. 610-616. 2014.

SALUM, T. F. C.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; YAMAMOTO, C. I.; CÔCCO, L. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. **Process Biochemistry**. v. 45, n. 8, p. 1348-1354. 2010.

SALUM, T. F. C.; PIGHINELLI, A. L. M. T.; DAMASO, M. C. T. Produção de biodiesel por catálise enzimática. In: MACHADO, C. M. M. (Ed.). **Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos**. Brasília, DF: Embrapa, 2013, p. 257-276.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANDANA-MALA, J. G.; 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**. v. 53, n. 4, p. 247-253. 2007.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I.; *Pongamia pinnata* seed cake: a promising and inexpensive substrate for production of protease and lipase from *Bacillus pumilus* SG2 on solid state fermentation. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**. v. 48, p. 435-439. 2011.

SAPAK, Z.; MEON, S.; AHMAD, Z. A. M. Effect of endophytic bacteria on growth and suppression of *Ganoderma* infection in oil palm. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 10, n. 2, p. 127-132. 2008.

SCHUCHARDT, J. P.; SCHNEIDER, I.; MEYER, H.; NEUBRONNER, J.; VON SCHACKY, C.; HAHN A. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in

response to different omega-3 fatty acid formulations: a comparative bioavailability study of fish oil vs krill oil. **Lipids in Health and Disease**. v. 10, 145. 2011.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**. v. 30, n. 14, p. 2068-2069. 2014.

SENANAYAKE, S. P. J. N.; FICHTALI, J. Marine oils: single cell oil as a sources of nutraceuticals and speciality lipids: processing technologies and application. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Nutraceutical and Speciality Lipids and their Co-Products**. Boca Raton: CRC Press, 2006. p.251-280.

SETHI, B. K.; ROUT, J. R.; DAS, R.; NANDA, P. K.; SAHOO, S. L. Lipase production by *Aspergillus terreus* using mustard seed oil cake as a carbon source. **Annals of Microbiology**. v. 63, n. 1, p. 241-252. 2013.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and their health benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**. v. 9, p. 345-381. 2018.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research and Development**. v. 15, p. 213-223. 2011.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**. v. 42, n. 15, p. 6223-6235. 2013.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; LUCCIO, M. D.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Production of multifunctional lipases by *Penicillium verrucosum* and *Penicillium brevicompactum* under solid state fermentation of babassu cake and castor meal. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 34, n. 2, p. 145-152. 2011a.

SILVA, M. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTRO, A. M.; LUCCIO, M. D.; MAZUTTI, M. A.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D. Concentration, partial characterization and immobilization of lipase extract from *P. brevicompactum* by solid-state fermentation of babassu cake and castor bean cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 164, n. 6, p. 755-766. 2011b.

SILVA, J. N.; GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G. Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake. **PLOS ONE**. v. 9, n. 8, p. 1-9. 2014.

SILVA, C. O. G.; VAZ, R. P.; FILHO, E. X. F. Bringinf plant cell wall degrading enzymes into the lignocellulosic biorefinery concept. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. v. 12, n. 2, p. 277-289. 2017.

SIMAO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**. v. 31, p. 3210–3212. 2015.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme immobilization: an overview on methods, support material and applications of immobilized enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**. v. 79, p. 179-211. 2016.

SLOUKA, C.; KOPP, J.; SPADIUT, O.; HERWIG, C. Perspectives of inclusion bodies for bio-based products: curse or blessing? **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, p. 1143-1153. 2019.

SOARES, D.; PINTO, A.F.; GONÇALVES, A.G.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Biodiesel production from soybean soapstock acid oil by hydrolysis in subcritical water followed by lipase-catalyzed esterification using a fermented solid in a packed-bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 15-23. 2013.

SOCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**. v. 1, p. 52-71. 2017.

STOYANOVA, M.; PAVLINA, I.; MONCHEVA, P.; BOGATZEVSKA, N. Biodiversity and incidence of *Burkholderia* species. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. v. 21, n. 3, p. 306-310. 2007.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**. v. 41, p. 207-234. 2005.

SU, K. P.; TSENG, P. T.; LIN, P. Y.; OKUBO, R.; CHEN, T. Y.; CHEN, Y. W.; MATSUOKA, Y. J. Association of use of omega-3 polyunsaturated fatty acids with changes in severity of anxiety symptoms: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Network Open: Psychiatry**. v. 1, e182327. 2018.

SUN, S. Y.; XU, Y. Membrane-bound "synthetic lipase" specifically cultured under solid-state fermentation and submerged fermentation by *Rhizopus chinensis*: a comparative investigation. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 3, p. 1336-1342. 2009.

SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. **Bioresource Technology**. v. 100, n. 9, p. 2607-2612. 2009.

SUNDRAM, S. The effects of *Trichoderma* in surface mulches supplemented with conidial drenches in the disease development of *Ganoderma* basal stem rot in oil palm. **Journal of Oil Palm Research**. v. 25, n. 3, p. 314-325. 2013.

SUSANTO, A.; SUDHARTO, P. S.; PURBA, R. Y. Enhancing biological control of basal stem rot disease (*Ganoderma boninense*) in oil palm plantations. **Mycopathologia**. v. 159, p. 153-157. 2005.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 628-634. 2010.

TISMA, M.; TADIC, T.; BUDZAKI, S.; OSTOJCIC, M.; SALIC, A.; ZELIC, B.; TRAN, N. N.; NGOTHAI, Y.; HESSEL, V. Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production. **Processes**, v. 7, p. 465. 2019.

TOSCANO, L.; MONTERO, G.; STOYCHEVA, M.; GOCHEV, V.; CERVANTES, L.; CAMPBELL, H.; ZLATEV, R.; VALDEZ, B.; PÉREZ, C.; GIL-SAMANIEGO, M. Lipase production through solid-state fermentation using agro-industrial residues as substrates and newly isolated fungal strains. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. v. 27, n. 5, p. 4074-4077. 2013.

TRAN, D. T.; CHANG, J. S. Kinetics of enzymatic transesterification and thermal deactivation using immobilized *Burkholderia* lipase as catalyst. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 37, p. 481-491. 2014.

TROBO-MASEDA, L.; ORREGO, A. H.; MORENO-PÉREZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M.; ROCHA-MARTIN, J. Stabilization of multimeric sucrose synthase from *Acidithiobacillus caldus* via immobilization and post-immobilization techniques for synthesis of UDP-glucose. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 102, p. 773-787. 2018.

TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Princeton, NJ: Mimeographs Princeton University, 1953.

VALLADÃO, A. B. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 60, n. 4, p. 219-225. 2007.

VALLADÃO, A. B. G.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Performance of an anaerobic reactor treating poultry abattoir wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Environmental Engineering Science**. v. 28, n. 4, p. 299-307. 2011a.

VALLADÃO, A. B. G.; TORRES, A. G.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Profiles of fatty acids and triacylglycerols and their influence on the anaerobic biodegradability of effluents from poultry slaughterhouse. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 14, p. 7043-7050. 2011b.

VALENTE, A. M.; ALEXANDRE, V. M.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Pré-hidrólise enzimática da gordura de efluente da indústria de pescado objetivando o aumento da produção de metano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, n. 2, p. 483-488. 2010.

VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LUCCIO, M. D. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum*

in soybean meal. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 83, n. 1, p.47-54. 2008.

VASEGHI, Z.; NAJAFPOUR, G. D.; MOHSENI, S.; MAHJOUR, S. Production of active lipase by *Rhizopus oryzae* from sugarcane bagasse: solid state fermentation in a tray bioreactor. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 48, n. 2, p. 283-289. 2013.

VEERABHADRAPPA, M. B.; SHIVAKUMAR, S. B.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of *Jatropha curcas* seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in *Jatropha* seed cake using *Aspergillus versicolor* CJS-98. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 117, n. 2, p. 208-214. 2014.

VERGER, R. 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38. 1997.

VERMA, S.; KUMAR, R.; KUMAR, P.; SHARMA, D.; GAHLOT, H.; SHARMA, P. K.; MEGHWANSHI, G. K. Cloning, characterization and structural modeling of an extremophilic bacterial lipase isolated from saline habitats of the Thar desert. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 192, p. 557-572. 2020.

VIRGEN-ORTIZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-MURCIA, A.; BARBOSA, O.; RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Polyethylenimine: a very useful ionic polymer in the design of immobilized enzyme biocatalysts. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 5, n. 36, p. 7461-7490. 2017.

WHITE, T. J.; BRUNS, T. D.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.) **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. London, UK: Academic Press, 1990, p. 315-322.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. v. 138, n. 3, p. 663-670. 1979.

ZAINUDIN, N.; HASHIM, A. M.; ISA, N. M.; SEMAN, I. A. Analyses of bacterial communities in rhizosphere soil of symptomless and basal stem rot (BSR)-infected oil palm using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). In: 5th International Symposium on Applied Engineering and Sciences, poster B21, 2017, Malaysia. **Proceedings...** Serdang: Universiti Putra Malaysia, 2017, p. 21.

ZANOTTI, C.; MUNARI, S.; BRESCIA, G.; BARION, U. *Burkholderia gladioli* sinonasal infection. **Tropical Pathology**. v. X, p. X. 2018.

ZARAI, Z.; EDDEHECH, A.; RIGANO, F.; OTERI, M.; MICALIZZI, G.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; CACCIOLA, F. Characterization of monoacylglycerols and diacylglycerols rich in polyunsaturated fatty acids produced by hydrolysis of *Mustelus*

mustelus liver oil catalyzed by an immobilized bacterial lipase. **Journal of Chromatography A**. v. 1613, 460692. 2020.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**. v. 8, n. 2, 92. 2018.

ZHU, J.; LIU, Y.; YAN, Q.; PAN, L.; LI, Y.; LIANG, G.; WANG, Q. Isolation and characterization of a novel bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 producing alkaline lipase. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 29, p. 1043-1052. 2019.

ANEXOS

Anexo I:

Revisão da literatura: condições de cultivo para produção de lipases microbianas por fermentação em estado sólido;

Anexo II:

Artigo publicado na revista *Preparative Biochemistry and Biotechnology*;

Anexo III:

Secretoma de *Burkholderia gladioli* BRM58833 quando cultivada em farelo de trigo e óleo de soja por fermentação em estado sólido;

Anexo IV:

Sequências dos genes *Lip* e *Lif* de *Burkholderia gladioli* BRM58833.

ANEXO I - Revisão da literatura: condições de cultivo para produção de lipases microbianas por fermentação em estado sólido

Year	Reference	Microrganism	Substrate and Oil Source	Temperature (°C)	initial pH	Moisture	Inoculum	Incubation Time (h)	Reactor Type	Industrial Aim	Extraction
1991	Rivera-Muñoz <i>et al.</i>	<i>Penicillium camembertii</i>	Wheat Bran	29	7.0	50%	1mL (OD 0.06 / 540nm)	144	Erlenmeyer (250mL)	Flavor Generation	Succinate Buffer 20mM pH 6.0
1991	Rivera-Muñoz <i>et al.</i>	<i>Penicillium candidum</i>	Wheat Bran	29	7.0	50%	1mL (OD 0.06 / 540nm)	144	Erlenmeyer (250mL)	Flavor Generation	Succinate Buffer 20mM pH 6.0
1991	Rivera-Muñoz <i>et al.</i>	<i>Mucor miehei</i>	Wheat Bran	29	7.0	50%	1mL (OD 0.06 / 540nm)	144	Erlenmeyer (250mL)	Flavor Generation	Succinate Buffer 20mM pH 6.0
1993	Ortíz-Vázquez <i>et al.</i>	<i>Penicillium candidum</i>	Wheat Bran	29	7.0	67.5%	OD 0.06 / 360nm	192	Erlenmeyer (250mL)	-	Succinate Buffer 20mM pH 6.0
1993	Venkata Rao <i>et al.</i>	<i>Candida rugosa</i>	Rice Bran	30	6.0	2.2g/g Bran	269 . 10 ⁶ Cells/g	48	Petriplates	-	-
1993	Venkata Rao <i>et al. (B)</i>	<i>Candida rugosa</i>	Rice Bran	30	6.0	2.2g/g Bran	269 . 10 ⁶ Cells/g	48	Tray Fermenter	-	-
1994	Bhushan <i>et al.</i>	<i>Candida sp.</i>	Rice Bran + RB Oil 10%	30	8.5	1:1 (w/v)	5% (v/w 24h culture)	96	Petriplates	-	-
1995	Christen <i>et al.</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	Anionic Resin (Amberlite IRA-900) + 20g/L Dextrin	29	6.0	58% water content	10 ⁷ spores/g	20	Column Fermenter	-	-
1996	Lin <i>et al.</i>	<i>Neurospora sp.</i>	Wheat Bran	30	7.0 (water)	1:1 (w/v)	-	96	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer 50mM pH7.0
1998	Christakopoulos <i>et al.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Tomato Skins	30	7.0	70%	10 ⁵ spores/mL	120	Erlenmeyer (100mL)	-	distilled water
1998	Cordova <i>et al.</i>	<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	Olive Oil Cake + SugarCane Bagasse 1:1	-	-	-	-	24	Column Fermenter	-	-
1998	Cordova <i>et al.</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i>	Olive Oil Cake + SugarCane Bagasse 1:1	-	-	-	-	28	Column Fermenter	-	-
1998	Kamini <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Gingelly Oil Cake	30	7.0 (water)	1:1.5 (w/v)	1.07 . 10 ⁸ spores/10g	72	Erlenmeyer (250mL)	Detergents & Laundry	distilled water
1999	Gombert <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 2% Olive Oil (w/w)	30	5.0	70%	10 ⁸ spores/inoculum	24	Polypropylene Beakers	-	Na Phosphate Buffer (50mM pH 7.0)
2000	Castilho <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 2% Olive Oil (w/w)	-	-	-	-	24	Tray Type Reactors	Economical Analysis	-
2000	Palma <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu Cake	30	5.0	70%	10 ⁸ spores/inoculum	24	Polypropylene Beakers	-	Phosphate buffer 50mM pH7.0
2001	Benjamin & Pandey	<i>Candida rugosa</i>	Coconut Oil cake:Wheat Bran 1:2	28	-	-	-	72	Column Fermenter	Biomedical and Pharmaceutical	distilled water

2002	Leal <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 1% Olive Oil (w/w)	-	7.0 (water)	70%	10 ⁸ spores/g	24	Polypropylene Beakers	Wastewater Treatment	Phosphate buffer 50mM pH7.0
2002	Mahadik <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Bran + Olive Oil	30	5.5	1:2.5 (w/v)	10 ⁶ spores	120	Erlenmeyer (500mL)	Food, beverage and pharmaceutical	NaCl 1% + Triton X-100 0.5%
2002	Ramarethinam <i>et al.</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	Wheat / Rice Bran + Sucrose + 1% Olive Oil	-	-	70-80%	-	96	Tray Type Reactors	Flavor / Aroma	distilled water
2002	ul-Haq <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Almond Meal	30	6.0	-	1% Inoculum size	48	Erlenmeyer (250mL)	Detergents & Laundry	Phosphate buffer
2003	Domínguez <i>et al.</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Triturated Nut + 20g/L Glucose	30	6.0	-	2% v/v	264	Erlenmeyer (250mL)	-	-
2002	Han <i>et al.</i>	<i>Actinomucor elegans</i>	Sufu Pehtze (Tofu preparation)	25	-	76.8%	sprayed spore suspension	48	Plastic Trays	Food Industry	NaCl 0.3M + Phosphate Buffer 0.2M pH6.8
2003	Han <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Sufu Pehtze (Tofu preparation)	35	-	76.8%	sprayed spore suspension	48	Plastic Trays	Food Industry	NaCl 0.3M + Phosphate Buffer 0.2M pH6.8
2004	Di Luccio <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Soy Cake + 4% Olive Oil	27	6.5 - 7.0	70%	10 ⁸ spores/g	96	Polypropylene Beakers	Wastewater Treatment	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2004	Miszkievicz <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Dehulled Pea Seeds	37	-	-	0.01% (10 ⁶ spores/mL)	48	SWiNG-Solid-State-Reactor	-	0.2% Tween-20
2005	Cavalcanti <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	27	7.0 (water)	70%	10 ⁷ spores/g	-	Fixed-Bed Bench Scale Bioreactor	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2005	Gutarra <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	<28	7.0 (water)	70%	10 ⁷ spores/g	48	Packed-Bed Bioreactor	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2006	Colen <i>et al.</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Rice Hulls + Olive Oil Emulsion	30	7.0	10mL/15g	10 ⁶ spores/mL	96	Erlenmeyer (250mL)	-	distilled water
2006	Falony <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Bran + 1.5% Olive Oil	30	-	65%	10 ⁷ spores/mL	168	Erlenmeyer (250mL)	-	distilled water
2006	Leal <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>									
2006	Mateos Diaz <i>et al.</i>	<i>Rhizopus homothallicus</i>	SugarCane Bagasse + Olive Oil (40g/L)	40	6.5	75%	3.10 ⁷ spores/g	12	Column Fermenter	-	Tris-HCl 20mM pH 8.0 (0,5%Triton X-100 + 2mM benzamidine)
2006	Nagy <i>et al.</i>	<i>Gliocladium roseum</i>	Wheat Bran + 1% Palm Oil	30	6.0	60%	10 ⁶ spores/g	72	Erlenmeyer (500mL)	kinetic resolutions of racemic	0.1% Tween-80
2006	Nagy <i>et al.</i>	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Wheat Bran + 1% Olive Oil	30	6.0	60%	10 ⁶ spores/g	72	Erlenmeyer (500mL)	kinetic resolutions of	0.1% Tween-80

racemic											
2006	Rodriguez <i>et al.</i>	<i>Rhizopus homothallicus</i>	SugarCane Bagasse + Olive Oil (40g/L)	40	6.5	75%	3.10 ⁷ spores/g	12	Column Fermenter	-	Triton X-100 0.5% (w/v)
2006	Rosa <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 0.75% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	7.0 (water)	70%	10 ⁷ spores/g	20	Tray Type Reactors	Wastewater Treatment	-
2007	Alkan <i>et al.</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	Melon Waste + 2% Olive Oil	37	7.0	-	15% (3.5.10 ⁸ spores/mL)	24	Erlenmeyer (250mL)	-	Tris-HCl 50mM pH 7.0
2007	de Azeredo <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 1% Olive Oil (w/w)	30	-	70%	10 ⁷ spores/g	24	Small Trays	-	Na Phosphate Buffer (50mM pH 7.0)
2007	Fernandes <i>et al.</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Corn Bran + 5% Corn Oil	29	7.0	55%	10 ⁸ Cells/mL	72	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	2% (w/v) NaCl Solution
2007	Gutarra <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	30	7.0 (water)	70%	10% w/w previous SSF culture	36	Tray Type Reactors	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2007	Kudanga <i>et al.</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Wheat Bran + 0.5% Olice Oil + 0.5% Fructose	25	7.0 (water)	2,5mL/1.5g	10mm Disks (Petri Plates)	168	MacCartney Bottles	-	distilled water
2006	Mateos Diaz <i>et al.</i>	<i>Rhizopus homothallicus</i>	SugarCane Bagasse + Olive Oil (40g/L)	40	6.5	75%	3.10 ⁷ spores/g	12	Column Fermenter	-	0.5% Triton X-100
2007	Romano <i>et al.</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Rice Hulls + Tween-80 0.5%	28	5.8	13,5mL/10g	2 . 10 ⁶ spores/mL	48	Petri Dishes	Flavor Generation	-
2007	Romano <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Rice Hulls + Tween-80 0.5%	28	5.8	13,5mL/10g	2 . 10 ⁶ spores/mL	48	Petri Dishes	Flavor Generation	-
2007	Sandana Mala <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Bran (75%) + Gingelly Oil Cake (25%)	30	7.0 (water)	62%	1.07 . 10 ⁷ spores/g	72	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	distilled water
2007	Töke <i>et al.</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	Wheat Bran	30	6.0	67%	10 ⁶ spores/g	48	Erlenmeyer (500mL)	Food/Cosmetic Industries	0.1% Tween-80
2007	Töke <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sojae</i>	Wheat Bran	30	6.0	67%	10 ⁶ spores/g	48	Erlenmeyer (500mL)	Food/Cosmetic Industries	0.1% Tween-80
2007	Valladão <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 2.5% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	-	70%	10 ⁸ spores/g	20	Tray Type Reactors	Effluent Treatment (Slaughterhouse)	-
2008	Damasceno <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 0.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	-	70%	10 ⁷ spores/g	20	Tray Type Reactors	Wastewater Treatment	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2008	Damaso <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>									
2008	Dutra <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Bran + 2% Castor Oil	32	7.0	60%	10 ⁷ spores/g	96	Column Fermenter	Biodiesel	-

2008	Kempka <i>et al.</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	Soybean Bran	27.5	7.0 (water)	55%	10 ⁸ spores/g	72	Erlenmeyer	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2008	Mahanta <i>et al.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Jatropha</i> Seed Cake + Maltose	30	7.0	50%	200μL Pre-Inoculum	120	Erlenmeyer (150mL)	Biodiesel	Tris-HCl 100mM pH 8.0
2008	Martins <i>et al.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Rice Bran + Soybean Oil 1%	30	4.5	50%	4 . 10 ⁶ spores/g	120	Column Fermenter	Bioremediation	-
2008	Martins <i>et al.</i>	<i>Phialemonium sp.</i>	Rice Bran + Diesel 1%	30	4.5	50%	4 . 10 ⁶ spores/g	120	Erlenmeyer (1000mL)	Bioremediation	-
2008	Martínez-Ruiz <i>et al.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	Perlite + Olive Oil (40g/L)	45	6.5	60%	3.10 ⁷ spores/g	20	Column Fermenter	-	-
2008	Ramírez <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Sugarcane Bagasse: Coffee Pulp (1:1) + Glucose 5g/L	30	6.5	75%	3.10 ⁷ spores/g	24	Column Fermenter	-	2.5mM3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) buffer (pH 7.2)
2008	Rigo <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu Cake (Patent 0007101-3, Brazil)	-	-	-	-	-	-	Wastewater Treatment	-
2008	Rigo <i>et al. (B)</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu Cake (Patent 0007101-3, Brazil)	-	-	-	-	-	-	Wastewater Treatment	-
2008	Sun & Xu	<i>Rhizopus chinensis</i>	Wheat Flour/Wheat Bran (3/2, w/w) + 2% Olive Oil (v/w)	30	6.5	70%	10 ⁷ spores/inoculum	72	Erlenmeyer (250mL)	Flavor Generation	distilled water
2008	Vargas <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Soybean Meal	27.5	7.0 (water)	55%	10 ⁸ spores/g	80	Cylindrical Reactors	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2009	Colla <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sp. E6</i>	Rice Husk:Wheat Bran (1:6) + 2% Olive Oil	30	6.0	60%	2 . 10 ⁶ spores/g	192	Erlenmeyer (300mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2009	Colla <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sp. O4</i>	Rice Husk:Wheat Bran (1:6) + 2% Olive Oil	30	6.0	60%	2 . 10 ⁶ spores/g	192	Erlenmeyer (300mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2009	Contesin <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Bran+ Olive oil 0,16%	25	-	20% (water content)	10 ⁵ ~10 ⁶ spores/mL	96	Erlenmeyer (250mL)	-	-
2009	Cunha <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	-	-	70%	10 ⁷ spores/g	72	-	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2009	Fregolente <i>et al.</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	Wheat Flour + 1% Glucose + 1% Olive Oil	30	6.0	40% (water content)	-	96	Erlenmeyer (500mL)	Food/Cosmetic Industries	1% (w/v) NaCl Solution
2009	Godoy <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Castor Bean Waste + 4% Sugar Cane Molasses (w/w)	30	6.4	42%	10 ⁷ spores/g	72	Tray Type Reactors	Detoxification	Phosphate buffer 100mM pH7.0

2009	Griebeler <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Soybean Bran	27.5	-	55%	10 ⁸ spores/g	48	Erlenmeyer	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2009	Griebeler <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Soybean Bran	27.5	-	55%	10 ⁸ spores/g	48	Erlenmeyer	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2009	Gutarra <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	30	-	70%	10 ⁷ spores/g	72	Tray Type Reactors	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2009	Hernández-Rodríguez <i>et al.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	Perlite + 0.6% Olive Oil	45	6.5	55%	3.10 ⁷ spores/g	20	Column Fermenter	-	distilled water 1:10 (w/v)
2009	Menoncin <i>et al.</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	Soybean Bran	27.5	7.0 (water)	55%	4 . 10 ⁸ spores/g	-	Polypropylene Beakers	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0)
2009	Mohanasrinivasan <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sp.</i>	Biopharmaceutical Oil Waste	30	6.0	70%	10% inoculum 10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (1000mL)	-	distilled water
2009	Mohanasrinivasan <i>et al.</i>	<i>Trichoderma sp.</i>	Biopharmaceutical Oil Waste	30	6.0	70%	10% inoculum 10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (1000mL)	-	distilled water
2009	Mohanasrinivasan <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Biopharmaceutical Oil Waste	30	6.0	70%	10% inoculum 10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (1000mL)	-	distilled water
2009	Rosa <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Babassu cake + 2.5% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	7.0 (water)	70%	10 ⁷ spores/g	20	Tray Type Reactors	Wastewater Treatment	-
2009	Sun <i>et al. (A)</i>										
2009	Sun <i>et al. (B)</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>	Wheat Flour/Wheat Bran (3/2, w/w) + 2% Olive Oil (v/w)	30	6.5	70%	10 ⁷ spores/inoculum	72	Erlenmeyer (250mL)	Flavor Generation	distilled water
2009	Sun <i>et al. (C)</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>	Wheat Flour/Wheat Bran (3/2, w/w) + 2% Olive Oil (v/w)	30			1.5 . 10 ⁶ spores/inoculum		Erlenmeyer (250mL)		Na Phosphate Buffer (50mM pH 7.5)
2009	Sun <i>et al. (D)</i>										
2009	Wolsk <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Soybean Bran	27	7.0 (water)	55%	10 ⁸ spores/g	48	Polypropylene Beakers	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Alberton <i>et al.</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (3:1) + glucose 1g/L + 1% Olive Oil	40	7.0 (water)	75-79%	3.10 ⁸ spores/mL	18	Erlenmeyer (250mL)	Wastewater Treatment	NaCl 20g/L
2010	Colla <i>et al.</i>	<i>Aspergillus sp. O4</i>	85.7% Soybean Meal + 14.3% Rice Husk + 2% Olive Oil	30	4.5	60%	2 . 10 ⁶ spores/g	96	Erlenmeyer (300mL)	-	Phosphate buffer 200mM pH7.0

2010	Edwinoliver <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Wheat Rawa:Coconut Oil Cake:Wheat Bran (1:1:2)	30	7.0 (water)	60%	$1.07 \cdot 10^7$ spores/g	96	Erlenmeyer (250mL)	-	NaCl 1% + Triton X-100 0.5%
2010	Hellner <i>et al.</i>										
2010	Kuhn <i>et al.</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	-	-	70%	10^7 spores/g	72	-	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Kuhn <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Jatropha curcas</i> Cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	-	-	70%	10^7 spores/g	72	-	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	López <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Barley Bran + Triton X-100 1g/L + Glucose 20g/L + Malt Extract 3g/L	30	6.0	15mL/4g	3 3mm Disks (Petri Plates)	120	Erlenmeyer (250mL)	-	distilled water
2010	Mahapatra <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Wheat Bran + Mahua Oil 10% + Glucose 50g/L	35	6.0	1.5:1	10^8 spores/inoculum	120	Erlenmeyer (250mL)	-	water
2010	Menoncin <i>et al.</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	Soybean Bran + 1% Olivell Oil	27.5	-	55%	10^8 spores/g	-	Erlenmeyer	-	Na Phosphate Buffer (pH 7.0)
2010	Rigo <i>et al. (A)</i>	<i>Penicillium sp. P58</i>	Soybean Meal + Soybean Oil 0.33g/100g	27	6.7	55%	10^8 spores/g	72 / 120 / 48	Cylindrical Tray Reactors	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Rigo <i>et al. (A)</i>	<i>Penicillium sp. P74</i>	Soybean Meal + Soybean Oil 0.33g/100g	27	6.7	55%	10^8 spores/g	48	Cylindrical Tray Reactors	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Rigo <i>et al. (B)</i>	69F (Fungus)	Soybean Meal	27	7.0 (water)	55%	10^8 spores/g	48	Cylindrical Reactors	Biodiesel / Flavor	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Rigo <i>et al. (B)</i>	161Y (Yeast)	Soybean Meal	27	7.0 (water)	55%	10^8 spores/g	48	Cylindrical Reactors	Biodiesel / Flavor	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Salum <i>et al.</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (50:50)	29	7.0	75%	1 mL Thawed Stock Culture	96	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	2% (w/v) NaCl Solution
2010	Salum <i>et al.*</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (50:50)	29	7.0	75%	2 mL Thawed Stock Culture	97	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	2% (w/v) NaCl Solution
2010	Valente <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu Cake	30	7.0 (water)	70%	-	72	-	Methane Production	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2010	Vardanega <i>et al.</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Soybean Meal	27	7.0 (water)	55%	$2 \cdot 10^6$ spores/mL	48	Cylindrical Reactors	-	Phosphate buffer 100mM pH8.5
2011	Alexandre <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane	30	-	70%	10^7 spores/g	72	Tray Type Reactors	Wastewater Treatment	-

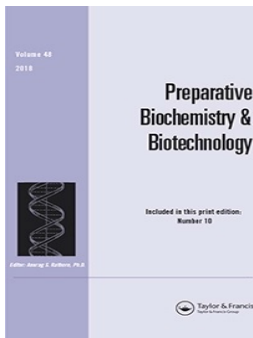
Molasses (w/w)											
2011	Amin <i>et al.</i>	<i>Ganoderma lucidum</i>	Canola Oil Cake + 2% Olive Oil	30	4.5	60%	10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (250mL)	-	-
2011	Godoy <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Castor Bean Waste	30	7.0 (water)	48.5%	10 ⁷ spores/g	96	Tray Type Reactors	Detoxification	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Iftikhar <i>et al.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Almond meal + Sunflower meal + Soybean meal 1:1:1 +Olive Oil 1%	28	7.0 (water)	1:1 (w/v)	4.63 . 10 ⁷ spores/mL	72	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer pH7.0
2011	Khoramnia <i>et al.</i>	<i>Acinetobacter sp.</i>	Coconut Oil Cake + Olive Oil 5%	30	6.5	90%	-	81.6	Erlenmeyer (250mL)	-	Na Phosphate Buffer (50mM pH 7.0)
2011	Kumar <i>et al.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Grease Waste:Wheat Bran (1:1)	30	7.0	1:1:2 (w/w/v)	10 ⁷ spores/inoculum	168	Erlenmeyer (250mL)	-	Na Phosphate Buffer
2011	Rajan & Nair	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Defatted Rice Bran	30	7.0 (water)	50%	10% inoculum spore solution	168	Erlenmeyer (250mL)	-	Tris-HCl 200mM pH 8.5
2011	Rehman <i>et al.</i>	<i>Penicillium notatum</i>	Canola Oil Seed Cake + Olive Oil 3% + Maltose 2%	30	5.0	60%	2mL Seed Culture	96	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Sangeetha <i>et al.</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pongamia pinnata</i> Seed Cake	37	7.0	60%	0.5mL Overnight Culture	96	Erlenmeyer (250mL)	Detergents & Laundry	Triton X-100 1% (w/v)
2011	Santis-Navarro <i>et al.</i>	Microbial Consortium	Winterization Residue:Raw Sludge + Wood Chips	>45	-	50%	-	336	Dewar Vessels (4.5 L)	-	Tris-HCl 100mM pH 8.0 + 2% Surfactant
2011	Silva <i>et al.</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Babassu cake + Soybean Oil	30	-	-	10 ⁷ spores/g	72	Erlenmeyer	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Silva <i>et al.</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Castor Bean Cake + Soybean Oil	30	-	-	10 ⁷ spores/g	-	Erlenmeyer	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Silva <i>et al. (B)</i>	<i>Penicillium verrucosum</i>	Babassu cake + 2% Soybean Oil + 4% SugarCane Molasses	30	7.0 (water)	55%	10 ⁷ spores/g	48	Erlenmeyer (500mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Silva <i>et al. (B)</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Castor Meal + 2% Soybean Oil	30	7.0 (water)	70%	10 ⁷ spores/g	96	Erlenmeyer (500mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2011	Valladão <i>et al.</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 2.5% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	-	70%	10 ⁷ spores/g	20	Tray Type Reactors	Effluent Treatment (Slaughterhouse)	-
2011	Valladão <i>et al. (B)</i>	<i>Penicillium restrictum</i>	Babassu cake + 2.5% Sugar Cane Molasses (w/w)	35	-	70%	10 ⁷ spores/g	20	Tray Type Reactors	Effluent Treatment (Slaughterhouse)	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2012	Andrade Santos <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Pumpkin Seed Flour	30	-	30%	10 ⁶ spores/mL	120	Petri Dishes	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0

2012	Damasceno <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	30	-	65%	10 ⁷ spores/g	48	Cylindrical Reactors	Effluent Treatment / Methane Production	-
2012	Esakkiraj <i>et al.</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	Red Grouper Waste (powder) + 0.2% Neem Oil + 0.2% Fructose	50	8.0	80%	2mL Seed Culture	72	Erlenmeyer (250mL)	-	distilled water
2012	Fraga <i>et al.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Wheat Bran	28	7.0 (water)	1mL/1g	2.6 . 10 ⁷ spores/Inoculum	72	Erlenmeyer (250mL)	Solution Resolution by Enantioselectivity	distilled water
2012	Kumar <i>et al.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Grease Waste:Wheat Bran (1:1)	30	7.0	1:1:2 (w/w/v)	10 ⁷ spores/inoculum	168	Erlenmeyer (250mL)	Bioremediation	Phosphate buffer 100mM
2012	Moftah <i>et al.</i>	<i>Candida utilis</i>	Olive Oil Cake	30	-	58%	2.5 . 10 ⁷ cells	96	Erlenmeyer (150mL)	-	distilled water 1:5 (w/w)
2012	de Paris <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Conventional Soy + Maltose & Dextrose (15 gm each/L)	30	-	50%	-	72	Erlenmeyer (250mL)	-	Na Phosphate Buffer (50mM pH 7.0)
2012	Pliego-Sandoval <i>et al.</i>	<i>Rhizopus sp.</i>	SugarCane Bagasse + Olive Oil (40g/L)	40	6.5	75%	3.10 ⁷ spores/g	55	Column Fermenter	-	Tris-HCl 20mM pH 8.0 (0,5%Triton X-100)
2012	Rasera <i>et al.</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (3:1)	30	7.0	75%	1mL Spore Suspension	24	Erlenmeyer (250mL)	Food Industry	-
2012	Rasera <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (3:1)	25	7.0	75%	1mL Spore Suspension	24	Erlenmeyer (250mL)	Food Industry	-
2012	Rigo <i>et al.</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	Soybean Bran + Soybean Oil 6g/kg	20	-	750g/kg	2 . 10 ⁸ spores/g	96	Polypropylene Beakers	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2013	Bhatti & Amin	<i>Ganoderma lucidum</i>	Canola Oil Cake + 2% Olive Oil	30	4.5	60%	10 ⁷ - 10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (250mL)	-	-
2013	Coradi <i>et al.</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Castor Bean + SugarCane Bagasse (1:1) +1% Olive Oil (v/w)	28	7.0	55%	10 ⁸ spores/mL	96	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	1% (w/v) NaCl Solution
2013	Dayanandan <i>et al.</i>	<i>Aspergillus tamarii</i>	Wheat Bran + 2.5% w/w Gingili Oil Cake + 1% w/w Gingili Oil + 0.5% w/w Glucose	28	7.0 (water)	70%	2% v/w 10 ⁶ spores/mL	120	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	Phosphate buffer 100mM pH7.0 + 0.1% Tween-80
2013	Imandi <i>et al.</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Mustard Oil Cake + Glucose 7%	30	-	50%	-	96	Erlenmeyer (250mL)	-	distilled water
2013	Khoramnia <i>et al.</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	Coconut Flakes + Coconut Oil	30	7.0 (water)	29%	2mL Seed Culture	216	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0

2013	Liu <i>et al.</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (5:3) + 8% Olive Oil	28	7.0	50%	1 mL Thawed Stock Culture	96	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	-
2013	Malilas <i>et al.</i>	<i>Penicillium camembertii</i>	Wheat Bran + 1% Olive Oil	30	6.0	63%	5 . 10 ⁵ spores/mL	192	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	distilled water
2013	Moftah <i>et al.</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Olive Oil Cake (Alkaline treated)	30	7.0	55%	2.5 . 10 ⁷ cells	96	Erlenmeyer (150mL)	-	distilled water
2013	Oliveira <i>et al.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Crambe Oil-Seed Meal + 10mL/kg Olive Oil	28	7.0	60%	10 ⁸ spores/inoculum	120	Erlenmeyer (250mL)	-	1% (w/v) NaCl Solution
2013	Reinehr <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Soybean Bran : Soybean Hulls (8:2) + Soybean Oil 1%	30	6.2	65%	10 ⁷ spores/g	96	Polypropylene Beakers	Biodiesel	-
2013	Reinehr <i>et al.</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Soybean Bran : Soybean Hulls (8:2) + Soybean Oil 1%	30	6.2 / 4.5	65%	10 ⁷ spores/g	96	Polypropylene Beakers	Biodiesel	-
2013	Salgado <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Two-phase Olive Mill Waste + 25% Exhausted Grape Marc	25	-	75%	2 . 10 ⁶ spores/erlenmeyer	336	Erlenmeyer (500mL)	-	1% NaCl 0.5% Triton X-100
2013	Salgado <i>et al.</i>	<i>Aspergillus uvarum</i>	Two-phase Olive Mill Waste + 25% Exhausted Grape Marc	25	-	75%	2 . 10 ⁶ spores/erlenmeyer	168	Erlenmeyer (500mL)	-	1% NaCl 0.5% Triton X-100
2014	Salgado <i>et al.</i>	<i>Aspergillus ibericus</i>	Two-phase Olive Mill Waste + 25% Exhausted Grape Marc	25	-	75%	2 . 10 ⁶ spores/erlenmeyer	120	Erlenmeyer (500mL)	-	1% NaCl 0.5% Triton X-100
2013	Sethi <i>et al.</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	Mustard Oil Cake + Neem Oil Cake (9:1)	30	6.0	80%	6% (w/v) (10 ⁷ spores/mL)	96	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH6.5
2013	Soares <i>et al.</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (50:50)	29	7.0	75%	8mL Seed Culture	72	Erlenmeyer (2000mL)	Biodiesel	-
2013	Vaseghi <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	SugarCane Bagasse + Olive Oil 8%	45	-	80%	48h Seed Culture 3mL/g	72	Tray Fermenter	Food Industry	1% NaCl + 1% Triton X-100
2013	Zawadzki <i>et al.</i>	<i>Rhizopus microsporus</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (3:1)	40	7.0	170mL/40g	1.2 . 10 ⁹ spores/inoculum	18	Erlenmeyer (1000mL)	Wastewater Treatment	-
2014	Amin & Bhatti	<i>Penicillium fellutanum</i>	Canola Seed Oil Cake + 2% Olive Oil + Glucose 1%	30	4.0	50%	10 ⁸ spores/mL	48	Erlenmeyer (250mL)	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2014	Andrade Santos <i>et al.</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Pumpkin Seed Flour	30	-	30%	10 ⁵ spores/g	120	Petri Dishes	-	Phosphate buffer 100mM pH7.0

2014	de Andrade Silva <i>et al.</i>	<i>Lichtheimia ramosa</i>	Guavira Waste	30	5.5	60%	10% (w/v) of the main culture	960	Tray Type Reactors	-	distilled water
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	37	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Mucor corticolus</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	25*	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	37	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Umbelopsis autotrophica</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	20	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Umbelopsis ramanniana</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	25	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Kotogán <i>et al.</i>	<i>Umbelopsis versiformis</i>	Wheat Bran + glucose 1.5% + olive oil 1.5%	20	-	65%	1% Inoculum size (10 ⁶ spores)	168	Erlenmeyer (250mL)	Flavor / Aroma	Na Acetate Buffer 100mM pH6.0
2014	Liu <i>et al.</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Sugarcane Bagasse : Sunflower Seed Meal (5:3) + 10% Olive Oil	37	7.0	75%	15mL Seed Culture	96	Erlenmeyer (250mL)	Biodiesel	-
2014	Sahoo <i>et al.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	Olive Oil Cake	37	7.0 (BHB Sigma)	1:2.5 (w/v)	5% culture (v/v 48h old)	96	Aluminium Tray	Biodiesel/Oily Water Treatment	Phosphate buffer 100mM pH7.0
2014	Silva <i>et al.</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Babassu cake + 6.25% Sugar Cane Molasses (w/w)	30	-	65%	10 ⁷ spores/g	72	Tray Type Reactors	-	Na Phosphate Buffer (100mM pH 7.0) + 0.5% Tween 80
2014	Toscano <i>et al.</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	Wheat Bran + 30% Castor Oil Cake	29	7.0	64%	10 ⁶ spores/g	96	Glass Flasks	-	1% (w/v) NaCl Solution
2014	Toscano <i>et al.</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Wheat Bran + 2% Olive Oil	29	7.0	64%	10 ⁶ spores/g	120	Glass Flasks	-	1% (w/v) NaCl Solution
2014	Toscano <i>et al.</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Wheat Bran + 2% Olive Oil	29	6.0	64%	10 ⁶ spores/g	120	Glass Flasks	-	1% (w/v) NaCl Solution
2014	Toscano <i>et al. (B)</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	Wheat Bran + 2% Olive Oil	29	6.0	65%	10 ⁶ spores/g	120	Erlenmeyer (250mL)	-	1% (w/v) NaCl Solution
2014	Veerabhadrapa <i>et al.</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	Jatropha Seed Cake + Maltose 2%	25	7.0	40%	10 ⁷ spores/5g	96	Erlenmeyer (150mL)	-	distilled water

ANEXO II – Artigo publicado na revista *Preparative Biochemistry and Biotechnology*





Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain

Pedro Alves Martins, Thályta Fraga Pacheco, Brenda Rabello de Camargo, Janice Lisboa De Marco & Thaís Fabiana Chan Salum

To cite this article: Pedro Alves Martins, Thályta Fraga Pacheco, Brenda Rabello de Camargo, Janice Lisboa De Marco & Thaís Fabiana Chan Salum (2021): Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, DOI: [10.1080/10826068.2021.1910959](https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1910959)


To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1910959>

 View supplementary material [↗](#)

 Published online: 03 May 2021.

 Submit your article to this journal [↗](#)


 Article views: 40

 View related articles [↗](#)

 View Crossmark data [↗](#)



Solid-state fermentation production and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Burkholderia gladioli* strain

Pedro Alves Martins^{a,b}, Thályta Fraga Pacheco^a, Brenda Rabello de Camargo^a, Janice Lisboa De Marco^c, and Thaís Fabiana Chan Salum^a 

^aEmbrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB, Brasília-DF, Brazil; ^bInstituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil; ^cFaculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília-DF, Brazil

ABSTRACT

The newly isolated *Burkholderia gladioli* BRM58833 strain was shown to secrete an alkaline lipase highly active and stable in organic solvents. Lipase production was optimized through the cultivation of the strain by solid-state fermentation in wheat bran. The lipase extraction conditions were also optimized. The low-cost extract obtained has shown a high hydrolytic activity of 1096.7 ± 39.3 U-gds⁻¹ (units per gram of dry solids) against pNPP and 374.2 ± 20.4 U-gds⁻¹ against triolein. Proteomic analysis revealed the optimized extract is composed of two esterases and three true lipases, showing a preference for long-chain substrates. The highest activity was obtained at 50 °C and pH 9. However, the extract maintained more than 50% of its maximum activity between pH 8.0 and 10.0 and throughout the whole temperature range evaluated (32–70 °C). The enzymes were inhibited by SDS, EDTA, ZnSO₄ and FeCl₃ and activated by FeSO₄, MgCl₂ and BaCl₂. The lipases conserved their activity when incubated in solvents as acetonitrile, diethyl ether, *n*-heptane, *n*-hexane, toluene, methanol and *t*-butanol. The resistance of these lipases to solvents and expressive thermostability when compared to other lipases, reveal their potential both in hydrolysis reactions and in synthesis of esters.

KEYWORDS

Solid-state fermentation; process optimization; lipase; *Burkholderia gladioli*

1. Introduction

Lipases (E.C. 3.1.1.3) are carboxyl ester hydrolases that catalyze the hydrolysis of triacylglycerols to produce free fatty acids and glycerol. The hydrolysis function represents the physiological role of these enzymes in lipid metabolism, which occurs at a water/oil interface.^[1] Lipases have also been applied to catalyze transesterification, interesterification and esterification reactions of not only triacylglycerols, but also other varieties of esters. In addition to this catalytic diversity, lipases exhibit a relaxed specificity with respect to their substrates, being able to act on lipids with different unsaturation degrees and chain lengths. Lipases are, therefore, considered ideal biocatalysts with wide industrial applicability.

Burkholderia lipases are grouped within subfamily I.2 and are distinguished from other bacterial true lipases by having an amino acid sequence with high similarity to the main representative of the group, the *Burkholderia glumae* lipase.^[2] Together with *Pseudomonas*, *Burkholderia* species are recognized as efficient lipase secreting bacteria. *Burkholderia gladioli* is a Gram-negative bacterium that can be found in several ecological niches. Regarding the investigation of carboxylesterases derived from *B. gladioli*, little has been done, with few papers depicting the production of esterases^[3,4] and only one studying true lipases.^[5] Recently, our research group has isolated the strain *B. gladioli* BRM58833 out of oil-palm fruits, which stood out of other isolated bacteria as the best lipase producer. This

is the first work of optimization of true lipases production by *Burkholderia gladioli* by solid-state fermentation.



Solid-state fermentation has the advantage of the possibility of using low cost substrates as agro-industrial residues. Indeed, when compared to submerged fermentation, solid-state fermentation results in higher yields and higher quality products, such as more concentrated enzymes and extracts more stable at different pHs and temperatures.^[6,7] Furthermore, fermented solids have been used as naturally immobilized biocatalysts for synthesis reactions in lyophilized form.^[8,9] This approach can lead to lower costs of enzyme preparations since the solid substrate is relatively cheap and no extraction, purification and immobilization steps are required, indicating that solid-state fermentation is a process economically attractive.


In this regard, the aim of this work was to explore the potential of *B. gladioli* BRM58833 by optimizing lipase production as well as to characterize the crude enzymatic extract obtained so that it can be destined to a compatible application.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism

Burkholderia gladioli BRM58833 was previously isolated from oil-palm fruits and preserved in Luria Bertani (LB)

CONTACT Thaís Fabiana Chan Salum  thais.salum@embrapa.br  Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica – PqEB, Brasília, 70770-901 Brazil.

 Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1910959>.

This article has been republished with minor changes. These changes do not impact the academic content of the article.

medium with 20% (m/v) glycerol at -80°C . The strain is preserved in the Collection of Microorganisms and Microalgae Applied to Agroenergy and Biorefineries, Embrapa Agroenergia, Brasília, Brazil.

2.2. Solid-state fermentation and lipase extraction

To produce inoculum for the solid-state fermentations, one colony of *B. gladioli* BRM58833 was inoculated in LB broth and incubated at 28°C and 180 rpm, until it reached $A_{600\text{nm}}$ of 0.5, which represents mid-exponential phase.

For solid-state fermentation, 4g of dry substrate (wheat bran - Bünge) were used as substrate for cultivation in 250 mL Erlenmeyer flasks. Moistening solution was added to the substrate and homogenized to obtain 65% moisture (m/m, wet basis). The moisture content was confirmed in an infrared moisture analyzer (Gehaka IV 3100). To the moistened substrate, 5% (m/m) of a vegetable oil was added to each flask. The flasks were then sterilized at 121°C for 30 min. After cooling, they were inoculated with 1 mL of inoculum and incubated at 30°C .

After 5 days of cultivation, flasks were added with 30 mL extraction solution (Triton X-100 0.4% and gum arabica 0.1% (m/v) in sodium phosphate buffer $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0) and agitated at 150 rpm and 25°C for 1 h. the material was filtered and centrifuged at $10,700\times g$ and 4°C for 10 min (Multifuge X1R, Thermo Scientific). The supernatant, denominated crude enzymatic extract (CEE), was used in the analysis for the determination of lipolytic activity.

2.2.1. Optimization of cultivation conditions

As preliminary tests, the use of two different moistening solutions was evaluated: sodium phosphate buffer $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0 and synthetic culture medium (K_2HPO_4 $0.7\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; KH_2PO_4 $0.4\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; KNO_3 $3.54\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.01\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; NaCl $0.38\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; Yeast Extract $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.0). Two lipase production inducers were also evaluated: 5% (m/m) of olive oil (Borges) or soybean oil (Soya).

After determination of the best moistening solution and inducer, a central composite design was used to optimize cultivation conditions aiming at an increase in lipase production. Five levels and five independent culture variables were considered in the analysis. The alpha for orthogonality used was 1.84. Each defined experimental condition was carried out in triplicate totalizing 129 experiments. Variables considered were: temperature ranging from 20°C to 40°C (X_1), initial culture pH ranging from 4.7 to 8.3 (X_2), moisture content ranging from 40% to 65% (X_3), oil content ranging from 1% to 10% m/m (X_4) and optical density (600 nm) of the initial inoculum ranging from 0.2 to 1.5 (X_5). Lipase production was evaluated after 5 days of cultivation using the colorimetric method based on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters (*p*NPP).

2.2.2. Optimization of lipase extraction conditions

Initially, the use of different extractive solutions was evaluated (% in m/v): (1) distilled water; (2) Saline solution of NaCl 2%; (3) sodium phosphate buffer $50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0 (PB); (4) Tween-20 0.2% in PB; (5) Tween-80 0.2% in PB; (6) Triton X-100 0.4% in PB; and (7) Triton X-100 0.4% and gum arabic 0.1% in PB.

After determination of the best extraction solution, the conditions of preparation and use of the extraction solution were optimized using a central composite design with five independent variables and orthogonality alpha of 1.84. The experiment was conducted with each condition being extracted in triplicate totalizing 129 experiments. Variables considered were: temperature ranging from 5°C to 35°C (X_1), buffer ionic strength ranging from 10 to $110\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (X_2), extraction buffer pH ranging from 5.0 to 9.0 (X_3), amount of Triton X-100 ranging from 0% to 1% m/v (X_4) and amount of gum arabic ranging from 0.02% to 0.04% m/v (X_5). Lipase extraction was evaluated using the colorimetric method based on the hydrolysis of *p*NPP.

2.3. Lipase assay by colorimetric method

Lipolytic activities of CEEs were determined based on the methodology described by Winkler and Stuckmann^[10] with modifications. For the assay, 1 mL of solution A (3 mg of *p*-nitrophenyl palmitate - *p*NPP- in 1 mL of 2-propanol) was added to 9.0 mL of solution B ($50\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7 phosphate buffer; Triton X-100 0.44%; gum arabic 0.11%, m/v), under stirring. An aliquot of 0.9 mL of this mixture was transferred to a cuvette and 0.1 mL of the CEE was mixed in. Reactions occurred at 37°C and pH 7.0 for 1 min with readings every 10 s at 410 nm. The molar absorptivity of *p*-nitrophenol (*p*NP) at pH 7.0 was determined as $4681.1\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. One unit of activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release $1\mu\text{mol}$ of *p*NP per min under assay conditions. Lipolytic activity was expressed based on the original grams of dry solid (gds) from which the extract was prepared. All assays were performed in triplicate.

2.4. Lipase assay by titrimetric method

Lipolytic activities were also determined according to the methodology described previously by Diaz et al.^[11] The medium contained $66\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ triolein, tricapyrylin, tributyrin or olive oil; $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 ; $150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl in Tris-HCl buffer $2.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0 and was emulsified with gum arabic (3%, m/v). For each reaction, 20 mL of emulsion and 1 mL of diluted CEE were placed in a thermostated vessel with magnetic agitation and the release of free fatty acids was monitored during 5 min by titration, using $20\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH in an automatic titration system (Metrohm-Titrando Stat 902) set at a constant pH value. One unit of lipolytic activity (U) was defined as the amount of enzyme required to release $1\mu\text{mol}$ of free fatty acids per min under assay conditions. Lipolytic activity was expressed based on the original grams of dry solid (gds) from which

the extract was prepared. All assays were performed in triplicate.

2.5. Ms-based secretome analysis

A sample of 50 µg of crude enzymatic extract was precipitated with chilled acetone (1:5 sample:acetone mixture) at -20°C overnight and washed twice with pure chilled acetone. Following, the obtained pellet was suspended in 50 mmol·L⁻¹ ammonium bicarbonate buffer. Proteins were then reduced with 10 mmol·L⁻¹ dithiothreitol and alkylated with 40 mmol·L⁻¹ iodoacetamide, both for 30 min at 25°C and protected from light. The proteins were submitted to digestion with 1 µg of trypsin for 20 h at 37°C and 800 rpm. The resulting peptides were loaded onto a C18 Poros R2 resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pre-equilibrated in trifluoroacetic acid 0.1% (v/v), eluted by sequential washing with acetonitrile (ACN) 50% and 70%, vacuum-dried, and diluted in formic acid (FA) 0.1% (v/v). Obtained peptides were loaded into an EASY-nanoLC 1000 LC system (Thermo Fischer Scientific) equipped with an in-house packed 15 cm Reprosil AQ-Pur C18 column (3 µm) (Dr. Maish, Ammerbuch, Germany). Solvent A [ACN 5% (v/v) and FA 0.1% (v/v)] and solvent B [ACN 95% (v/v) and FA 0.1% (v/v)] were used in a gradient of 5–45% B in 55 min and 45–95% B in 10 min with a flow rate of 300 µL·min⁻¹. Peptides were eluted and injected into an Orbitrap Q Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) via an electrospray ionization probe. Spectra were acquired in data dependent acquisition (top 15) method considering a scan range of 375–2000 m/z at 70,000 resolution and maximum injection time of 50 ms. For MS/MS data an isolation window width of 3 Da and resolution of 17,500 was considered. Proteome Discoverer v2.1 (Thermo Fisher Scientific) and Sequest HT search engine were used to analyze LC-MS data using the *B. gladioli* genome (NCBI accession: QODE00000000) as the database considering carbamidomethylation of cysteines as fixed modifications and oxidation of methionine and acetylation of N-terminal ends as variable modifications. Parent spectra had a tolerance filter of 0.05 Da and tandem MS spectra of 10 ppm. The False Discovery Rate cutoff was 0.01 and the minimum amino acid sequence was set to 6 AA.

2.6. SDS-PAGE

For denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the crude enzymatic extract was precipitated with 20% trichloroacetic acid at 4°C overnight. The pellet was washed with pure chilled acetone followed by centrifugation at $20,000 \times g$ for 15 min for three cycles (Multifuge X1R, Thermo Scientific). The washed pellet was then suspended in 20 µL of sample buffer and separated in a SDS-PAGE (12%) prepared according to the traditional protocol described by Laemmli.^[12] Lipolytic activity was detected with a zymogram analysis as described by Prim et al.^[13] using 4-Methylumbelliferyl-Butyrate (MUF-butyrates) 100 µmol·L⁻¹ as substrate. Lastly, the SDS-PAGE was

stained with a Coomassie solution (Coomassie Brilliant Blue G-250 0.25% m/v; methanol 30% v/v; acetic acid 7% v/v).

2.7. Effect of ions, solvents and surfactants on lipolytic activity

The CEE had its lipolytic activity evaluated after incubation with different ions, derived from the following salts: AgNO₃, Al₂(SO₄)₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₃, FeSO₄, KCl, KF, KI, KNO₃, LiCl, MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, NaCl, NaNO₃, NH₄Cl, NiSO₄, Pb(NO₃)₂ and ZnSO₄. The influence of EDTA on lipolytic activity was also evaluated. The CEE was incubated for 5 min with each compound at a final concentration of 10 mmol·L⁻¹. Similarly, CEE had its lipolytic activity evaluated against incubation with different surfactants (SDS, Tween 80, Tween 20, Triton X-100, PEG-6000 and CHAPS) and solvents (acetone, acetonitrile, chloroform, diethyl ether, *n*-heptane, *n*-hexane, pyridine, toluene, methanol, ethanol, 2-propanol and *t*-butanol). CEE was incubated for 5 min with each surfactant at a final concentration of 1% (m/v). For solvents, CEE was incubated for 5 min at a final concentration of 10% (v/v). Lipolytic activities were measured based on the hydrolysis of *p*NPP and were always compared to the control condition incubated with distilled water.

2.8. Effect of temperature and pH on lipolytic activity

To determine the pH most fit for the CEE, lipolytic activities were evaluated at pH 7.5; 8.0; 8.5; 9.0; 9.5 and 10.0. Similarly, to determine the temperature most fit for the CEE, temperatures of 32; 37; 40; 45; 50; 55; 60; 65 and 70°C were evaluated. Lipolytic activities were measured by titrimetric method using triolein as substrate. All assays were performed in triplicate.

2.9. Effect of substrate carbon-chain length on lipolytic activity

For the evaluation of synthetic substrates, the colorimetric method was used with *p*-nitrophenyl esters of different carbon-chain lengths, namely: *p*NPP (Palmitate, C16:0), *p*NPL (Laurate, C12:0), *p*NPC (Caprylate, C8:0), *p*NPB (Butyrate, C4:0) and *p*NPA (Acetate, C2:0). For this experiment, all substrates were prepared with a concentration of 10 µmol·mL⁻¹ in 2-propanol. For the evaluation of natural substrates, the titrimetric method was used with different emulsified oils, namely tributyrin (C4:0), tricaprilin (C8:0), triolein (C18:1 Δ^9) and extra virgin olive oil.

2.10. Thermal stability

Thermal stability was determined by incubating CEE at different temperatures (30– 70°C) for 45.5 h. The residual activities were measured periodically by titrimetric method using triolein as substrate. First order inactivation kinetics was used to determine the *k*_d and *t*_{1/2}.

2.11. Statistical analysis

The Tukey test with 95% confidence interval was used to verify statistically significant differences between independent cultivations during preliminary experiments of solid-state fermentation.

For central composite design optimizations, the software Statistica™ 12.0 (Statsoft, Palo Alto, Ca-USA) was used for experiments design, regression, graphical analysis and analysis of variance. A significance level of 90% ($p < 0.1$) was considered due to the variability of the bioprocesses. Analysis of variance for regression was performed to verify if the models were significant and meets the requirements for the construction of response surfaces. Analysis of variance was also performed to ensure that the lack of fit was not significant for each model. Canonical analysis and eigenvalues were used to locate the stationary point of the responses and to determine whether it represents a maximum point. In case of functions with saddle point the model was used as an objective function and the experimental region as constraints condition in a nonlinear iterative numerical solution algorithm, selecting regions for which the response value returned by the function and constraints was greater than a defined value. To validate model predictions, additional fermentations and extractions were carried out under conditions predicted by the model.

The effect of ions, solvents and surfactants was evaluated using t -test ($\alpha = 5\%$) for comparison between the activities in presence and absence of each compound.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of *B. gladioli* BRM58833 cultivation for lipase production

For the optimization of lipase production, preliminary tests were carried out to determine the type of solution to be used to moisten the substrate and the type of inducer of lipase production. Lipase production was performed on wheat bran moistened with synthetic culture medium or sodium phosphate buffer $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, both solutions being buffered at pH 7.0. Concomitantly, the use of either soybean oil or olive oil as inducers of lipase production was evaluated. Lipolytic activities obtained for cultivation in buffer/olive oil, buffer/soybean oil, medium/olive oil and medium/soybean oil were 611.7 ± 24.0 ; 616.2 ± 28.5 ; 567.1 ± 52.7 and $572.6 \pm 43.4 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$, respectively. These activities were all statistically equivalent (Tukey, $p < 0.05$). Thus, in order to simplify substrate preparation and mitigate costs in lipase production, conditions chosen were moistening with sodium phosphate buffer and addition of soybean oil as inducer.

A central composite design was then performed considering temperature, pH, moisture content, oil content and optical density of the inoculum (Supplementary Table 1). After analysis of lipolytic activities of the crude enzymatic extract (CEE) for each experimental condition, a model (with coded variables and considering statistically significant parameters, $p < 0.1$) was obtained to describe the response

in lipolytic activity given the culture conditions (Equation 1).

$$\begin{aligned} \text{Lipolytic Activity (U} \cdot \text{gds}^{-1}) &= 299.2 + 100.9 \cdot X_3 + 70.2 \cdot X_4^2 - 49.0 \cdot X_3^2 - 48.8 \cdot X_4 \\ &- 44.8 \cdot X_1^2 + 43.5 \cdot X_1 \cdot X_3 + 40.8 \cdot X_5 - 38.8 \cdot X_3 \cdot X_4 \\ &- 29.8 \cdot X_2^2 - 29.0 \cdot X_5^2 + 25.5 \cdot X_1 \cdot X_4 - 20.0 \cdot X_2 \cdot X_3 \\ &- 18.1 \cdot X_3 \cdot X_5 - 15.5 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad R^2 = 0.898 \end{aligned} \quad (1)$$

Where X_1 corresponds to temperature, X_2 to pH, X_3 to moisture content, X_4 to oil content and X_5 to inoculum optical density in coded values.

The condition with the highest value calculated was chosen to be experimentally validated and corresponded to a temperature of 32.6°C ($X_1 = 0.46$), pH 5.8 ($X_2 = -0.7$), moisture content of 65% ($X_3 = 1.78$), oil content 1% m/m ($X_4 = -1.78$) and initial inoculum with $\text{OD}_{600\text{nm}} 0.9$ ($X_5 = 0.15$). The expected lipolytic activity for this condition was $778.6 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$. Validation culture was carried out and a lipolytic activity of $811.4 \pm 34.7 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$ was found. This value corresponded to an absolute error of $32.8 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$ and a relative error of 4.2%.

We have shown the first study of lipase production from *Burkholderia gladioli* by solid-state fermentation. After process optimization of the lipase production not only an increase in lipolytic activity was observed, but it was also possible to reduce the amount of oil as inducer for lipase production (from 5% to 1%), which reduces the cost of producing the enzyme.

3.2. Optimization of lipase extraction

Initially, seven extractive solutions were evaluated. Lipolytic activities obtained revealed an evident distinction among the use of each extractive solution (Figure 1). While there was no statistical difference observed between responses for extraction with water ($29.4 \pm 2.0 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$), saline solution ($35.2 \pm 2.2 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$), phosphate buffer ($39.4 \pm 2.4 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$), Tween-20 solution ($25.2 \pm 2.2 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$) and Tween-80 solution ($22.7 \pm 1.5 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$), the use of Triton X-100 ($215.8 \pm 15.5 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$) resulted in a 5.5-fold increase in activity when compared to the equivalent condition without the use of the surfactant (phosphate buffer). For the use of Triton X-100 and gum arabic, which resulted in the highest lipolytic activity ($805.1 \pm 64.0 \text{ U} \cdot \text{gds}^{-1}$), the difference becomes even clearer, with an increase in activity of 3.7-fold and a 20.4-fold when compared to the conditions obtained for Triton X-100 and phosphate buffer, respectively. These findings highlight an interesting question: the use of Triton X-100 and gum arabic as additives necessary to obtain a high lipolytic activity.

Although being hydrophilic on their surface, lipases are known to act precisely at the hydrophilic-hydrophobic interface due to the hydrophobicity of their substrates. Hydrophobic pockets present in the lipase structure allow them to interact with substrate molecules and can be responsible for the adsorption of these enzymes to hydrophobic surfaces.^[14] It has been demonstrated that Triton X-100 play a fundamental role in the

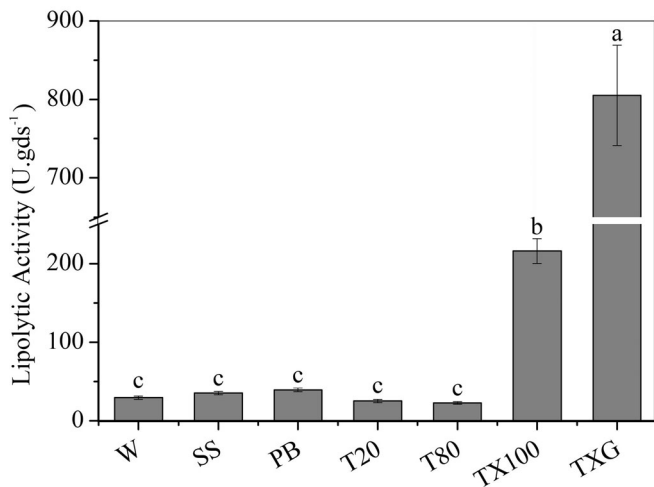


Figure 1. Lipolytic activities of crude enzymatic extracts obtained by cultivation of *Burkholderia gladioli* BRM58833 extracted with the following extractive solutions: W: distilled water; SS: NaCl 2%; PB: sodium phosphate buffer 50 mmol·L⁻¹ pH 7.0; T20: Tween-20 0.2% in PB; T80: Tween-80 0.2% in PB; TX100: Triton X-100 0.4% in PB; and TXG: Triton X-100 0.4% and gum arabic 0.1% in PB. Letters above columns represent statistical evaluation (Tukey test, significance level 5%). Different letters represent statistically different values. Analysis method: colorimetric – hydrolysis of pNPP at 37°C and pH 7.0. U·gds⁻¹: units per gram of dry solids.

extraction of lipases adsorbed to the fermented solids obtained in this work as well as in other studies.^[15] The use of gum arabic in combination with Triton X-100 potentiated the lipolytic activity found in almost four times when compared to the extraction without the use of this compound. Accordingly, it is possible that gum arabic plays a role either in stabilizing the lipase-surfactant complex during the extraction process, in the substrate-surfactant emulsion at the time of gauging the lipolytic activity or even affecting the interfacial activation phenomenon.

In order to further improve extraction, a central composite design was then performed considering the variables: buffer ionic strength and pH, amount of Triton X-100, amount of gum arabic and extraction temperature (Supplementary Table 2). After analysis of lipolytic activities of the CEEs for each extraction condition, using response surface methodology and experimental results a second order model (Equation 2) was proposed eliminating insignificant terms ($p < 0.1$) for lipolytic activity given the extraction conditions.

$$\begin{aligned}
 & \text{Extracted Activity (U} \cdot \text{gds}^{-1}) \\
 & = 812.1 - 131.2 \cdot X_4^2 + 118.9 \cdot X_4 - 103.7 \cdot X_1^2 \\
 & - 82.7 \cdot X_2^2 - 65.2 \cdot X_1 - 57.4 \cdot X_3 \cdot X_4 - 35.3 \cdot X_1 \cdot X_4 \\
 & - 31.9 \cdot X_1 \cdot X_2 + 31.8 \cdot X_3 + 27.5 \cdot X_2 \quad R^2 = 0.841
 \end{aligned} \quad (2)$$

Where X_1 corresponds to temperature, X_2 to buffer ionic strength, X_3 to pH, X_4 to Triton X-100 content and X_5 to gum arabic content in coded values.

For the model showed in Equation 2, the critical point was characterized as the maximum and corresponded to a temperature of 16.2°C ($X_1 = -0.447$), buffer ionic strength of 67.1 mmol·L⁻¹ ($X_2 = 0.252$), buffer pH of 6.8 ($X_3 = -0.186$), 0.7% Triton X-100 ($X_4 = 0.554$) and 0.1% gum arabic ($X_5 = -1.00$). At this point the expected lipolytic activity was 859.8 U·gds⁻¹. An extraction validation

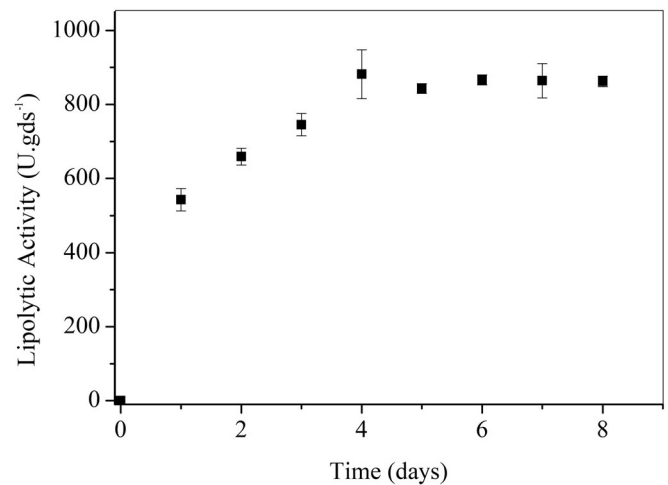


Figure 2. Lipase production curve by *Burkholderia gladioli* BRM58833 under optimized conditions of cultivation and extraction. Analysis method: colorimetric – hydrolysis of pNPP at 37°C and pH 7.0. U·gds⁻¹: units per gram of dry solids.

experiment was performed, using this optimal condition and an activity of 837.7 ± 12.7 U·gds⁻¹ was obtained. This value corresponded to an absolute error of 22.1 U·gds⁻¹ and a relative error of 2.6%. As observed, the data demonstrated that experimental values for lipolytic activity are in agreement with the predicted values.

3.3. Lipase production profile

Using both optimized conditions for lipase production and extraction, the profile of lipase production was studied during 8 days of cultivation. Samples of independent cultures were analyzed every 24 h, in triplicate (Figure 2). It was observed that an intense production of lipases occurs in the first days of cultivation, but on the fourth day (881.9 ± 66.0 U·gds⁻¹) the lipolytic activity reaches a plateau that remained established throughout the remaining evaluated days (862.4 ± 14.0 U·gds⁻¹ on the eighth day). Thus, it was determined that solid-state fermentation should be kept for 4 days, benefiting of the use of less resources and time to obtain the enzyme.

After optimizing both processes for the production and extraction of *B. gladioli* BRM58833 lipase, a new batch of CEE was obtained under optimized conditions and was used for all the experiments that followed. A lipolytic activity of 900.1 ± 66.0 U·gds⁻¹ was obtained, which corresponds to a 47.2% increase when compared to the activity obtained initially for the condition of culture moistened with buffer solution and induced with olive oil (611.6 ± 24.0 U·gds⁻¹). Compared to values published in the literature for bacteria grown by solid-state fermentation (Table 1), the lipolytic activity found for *B. gladioli* BRM58833 in our work is amongst the highest for unpurified lipases.

3.4. Secretome analysis

According to Gagic et al.^[26] bacteria secretomes (periplasmatic, membrane-bound or extracellular proteins)

Table 1. Lipolytic activities found in the literature concerning the cultivation of bacteria by solid-state fermentation.

Microorganism	Lipolytic activity ¹	Temperature	pH	Substrate	Enzyme form	Reference
<i>Burkholderia cepacia</i>	120.0 U·gds ⁻¹	37 °C	7.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.6 U·gds ⁻¹	37 °C	8.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	17
<i>Burkholderia cepacia</i>	234.0 U·gds ⁻¹	37 °C	7.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	8
<i>Bacillus pumilus</i>	984.0 U·gds ⁻¹	60 °C	11.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	15
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	72.0 U·gds ⁻¹	40 °C	n.i.	Olive Oil (Titration)	FES ³	9
<i>Burkholderia cepacia</i>	91.6 U·gds ⁻¹	40 °C	n.i.	Olive Oil (Titration)	FES ³	18
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	72.3 U·gds ⁻¹	37 °C	7.0	Olive Oil (Titration)	FES ³	19
<i>Pseudomonas</i> sp.	57.9 U·gds ⁻¹	50 °C	7.0	pNPL (C12:0)	CEE ²	20
<i>Shewanella</i> sp.	143.0 U·gds ⁻¹	37 °C	7.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	21
<i>Bacillus subtilis</i>	34.9 U·gds ⁻¹	30 °C	7.0	Olive Oil (Titration)	CEE ²	22
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.3 U·gds ⁻¹	60 °C	7.0	pNPL (C12:0)	CEE ²	23
<i>Bacillus licheniformis</i>	62.3 U·gds ⁻¹	50 °C	7.0	pNPL (C12:0)	CEE ²	24
<i>Bacillus smithii</i>	11.1 U·gds ⁻¹	65 °C	n.i.	pNPP (C16:0)	CEE ²	25
<i>Burkholderia gladioli</i>	900.1 U·gds ⁻¹	37 °C	7.0	pNPP (C16:0)	CEE ²	This work
<i>Burkholderia gladioli</i>	374.2 U·gds ⁻¹	50 °C	9.0	Triolein (Titration)	CEE ²	This work

1: U = $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$; 2: CEE: Crude Enzymatic Extract; 3: FES: Fermented Solids; n.i.: not informed.

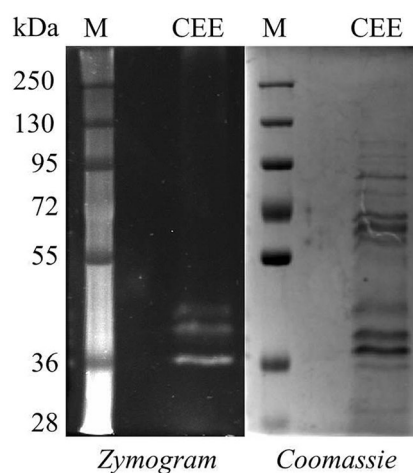
Table 2. Identified proteins with lipolytic activity in the secretome of *B. gladioli* BRM58833.

Access	Enzyme	E. C.	Size (kDa)
WP_165652138.1	Lipase	3.1.1.3	36.8
WP_017919347.1	Carboxylesterase NlhH	3.1.1.1	37.2
WP_165651549.1	Esterase EstA	3.1.1.1	38.3
WP_017919529.1	Hypothetical Protein (SGNH/GDSL hydrolase family)	3.1.1.3	45.4
WP_165651964.1	Lipase	3.1.1.3	45.8

correspond to 10–30% of their genomes coding capacity. Nevertheless, one must be aware that quantity and diversity of secreted proteins will fluctuate depending on environmental conditions and stimuli.

Experimental proteomic analysis of the optimized crude enzymatic extract returned 698 identifications. Of these, 163 had a predicted signal peptide and the remainder corresponded to intracellular proteins, which may have been released through cell lysis during cultivation or even during the extraction step, due to the use of Triton X-100. Since the purpose of this work was to find and characterize lipases, membrane-bound and periplasmatic proteins were discarded for the final analysis, which consisted of the subset of 64 extracellular proteins. Hypothetical protein sequences were compared to the NCBI database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) to infer their biological role. While those with no similarity to known proteins remained as hypothetical proteins, those with BLAST matches were further annotated and categorized accordingly. A representative portion of the secretome (33 proteins; 51.6%) was composed of enzymes, further categorized as peptidases (9 proteins; 14.1%), amidases (1 protein; 1.6%), esterases/lipases (5 proteins; 7.8%), other carboxylesterases (2 proteins; 3.1%), glycosidases (9 proteins; 14.1%), oxidoreductases (3 proteins; 4.7%), isomerases (3 proteins; 4.7%) and lyases (1 protein; 1.6%). Hypothetical proteins were 27 (42.2%), of which 10 had conserved domains of unknown function. Other proteins with no catalytic activity were 4, representing 6.3% of the secretome (Supplementary File 1).

Proteomic analysis revealed that the lipolytic activity of the crude enzymatic extract obtained from the cultivation of *B. gladioli* BRM58833 under optimized conditions is a combined action of two esterases and three lipases (Table 2). However, when evaluated in-gel, only three distinct lipolytic

**Figure 3.** SDS-PAGE and zymogram analysis of the crude enzymatic extract obtained from the cultivation of *Burkholderia gladioli* BRM58833 under optimized conditions. M: molecular weight marker; CEE: crude enzymatic extract.

activity bands are visualized (Figure 3). The band with the highest intensity in the zymogram seems to correspond to lipase WP_165652138.1, not only for its size of 36 kDa, but also for its features that fit the description of true lipases grouped with other *Burkholderia* lipases within the subfamily I.2 of lipolytic enzymes, such as the presence of a lipase specific foldase gene downstream to the lipase gene pathway.^[27] Although it is believed that one lipase might be the major contributor to the lipolytic activity found in the CEE, it is interesting to notice that the combined synergistic action of these esterases and lipases in one single enzymatic extract may broaden its activity and applications, enabling it to display different substrate specificities and leading to an increase in the rate of the reaction.^[28] For instance, in the context of biodiesel production, the use of such rich extracts represents an advantage, since raw substrates, like natural vegetable oils and animal fats, exhibit a heterogeneous composition of different fatty acid chain-lengths, saturation degrees and positioning in the glycerol backbone. Indeed, a study with *Thermomyces lanuginosus* lipases applied to the synthesis of biodiesel reported a higher yield of fatty acid methyl esters content with the use of a crude extract (unpurified enzyme) than with the use of the purified version.^[29] Most importantly, when possible, the use of

Table 3. Effect of additives on lipolytic activity of crude enzymatic extract obtained by cultivation of *Burkholderia gladioli* BRM58833.

Additives	Relative activity (%)	Additives	Relative activity (%)
None	100.0 ± 2.9		
Compounds (10 mmol·L ⁻¹)		Solvents (10% v/v)	
* AgNO ₃	81.0 ± 2.2	* Acetone	95.3 ± 1.7
* Al ₂ (SO ₄) ₃	79.4 ± 1.5	Acetonitrile	98.1 ± 2.6
* BaCl ₂	103.9 ± 2.0	* Chloroform	85.8 ± 3.4
CaCl ₂	100.7 ± 1.8	Diethyl Ether	99.6 ± 2.8
* CoCl ₂	96.4 ± 2.3	* <i>n</i> -Heptane	104.8 ± 2.2
CuSO ₄	94.2 ± 10.1	<i>n</i> -Hexane	101.3 ± 2.5
* FeCl ₃	63.0 ± 2.4	* Pyridine	105.2 ± 2.8
* FeSO ₄	112.3 ± 3.5	Toluene	101.4 ± 1.5
* KCl	95.7 ± 3.5	Methanol	96.8 ± 2.3
KF	97.9 ± 2.0	* Ethanol	97.1 ± 0.4
* KI	93.2 ± 1.5	* 2-Propanol	90.3 ± 3.1
KNO ₃	103.0 ± 4.4	<i>t</i> -Butanol	100.5 ± 3.9
* LiCl	96.9 ± 1.0		
* MgCl ₂	109.8 ± 1.8	Surfactants (1% w/v)	
MgSO ₄	98.0 ± 1.9	CHAPS	100.1 ± 5.4
MnCl ₂	100.4 ± 5.7	Gum Arabic	98.0 ± 2.1
* MnSO ₄	96.2 ± 2.1	PEG-6000	101.0 ± 4.5
NaCl	98.6 ± 2.1	Triton X-100	96.5 ± 3.8
NaNO ₃	98.1 ± 1.9	* Tween 20	94.6 ± 1.8
* NH ₄ Cl	96.5 ± 1.1	* Tween 80	92.4 ± 3.5
* NiSO ₄	81.3 ± 0.9	* SDS	3.8 ± 0.5
* Pb(NO ₃) ₂	77.1 ± 10.3		
* ZnSO ₄	51.5 ± 3.5		
* EDTA	8.1 ± 2.0		

Additives marked with asterisks had activities statistically different from control (*t*-test, significance level 5%). Analysis method: colorimetric – hydrolysis of pNPP at 37 °C and pH 7.0.

unpurified enzymes can represent significant savings in the biocatalytic process. Therefore, in order to apply the enzymes in their unpurified form, we characterized the catalytic properties of CEE.

3.5. Effect of ions, solvents and surfactants on lipolytic activity

The effect of additives to the reaction medium was evaluated in order to find possible lipase activators or inhibitors (Table 3). When comparing lipolytic activities, it is possible to observe that, although close to the relative activity of the control, many ions had a statistically significant effect (significance level $\alpha = 0.025$). Among the inhibitors, EDTA, ZnSO₄ and FeCl₃ promoted a loss of activity of 91.9%, 48.5% and 37.0%, respectively. On the other hand, FeSO₄, MgCl₂ and BaCl₂ behaved as activators, exhibiting a relative activity of 112.3%, 109.8% and 103.9%, respectively. Although the same effect has not been observed for all bivalent cations evaluated, it is interesting to note that all activators found belong to this category. Among iron ions, the difference promoted between the ferrous ion (bivalent cation) and the ferric ion (trivalent cation) is also highlighted, where the first acts as an activator and the latter as an inhibitor. As found for the *B. gladioli* BRM58833 lipase, other authors also found an inhibitory effect on lipases in presence of Zn²⁺.^[30,31] Likewise, the inhibitory effect of Fe³⁺ has also been reported.^[32,33] Regarding the activators, Mg²⁺ can be highlighted for also being reported as activator for other lipases.^[30] Boran et al.^[34] also reported a

significant increase in activity for *Streptomyces violascens* lipase in the presence of Fe²⁺. The effect of metal ions on lipase activity could result not only from a change in solubility and in the behavior of ionized fatty acids at the interface where the enzyme perform the reaction catalysis, but also from changes into intrinsic properties of the enzyme itself, like its folding.

In relation to other additives, CEE maintained its functional lipolytic activity when incubated with a broad spectrum of organic solvents and surfactants studied (Table 3). Resistance against organic solvents is an important feature of industrial lipases since such organic solvents may contribute to the solubility of hydrophobic substrates and products or even in the accessibility of the enzyme lipid-binding site. CEEs lipolytic activity was maintained even when incubated with polar solvents such as ethanol and methanol. In a study with *Pseudomonas* sp. S1, a loss of 8.4% in lipolytic activity was reported in the presence of 15% methanol.^[20] Thereby, short-chain alcohol tolerance represents an advantage of the *B. gladioli* BRM58833 lipase. Concerning the inhibitory effect of the addition of solvents, chloroform and 2-propanol had the most deleterious effect on lipase activity, resulting in a loss of 14.2% and 9.7% of activity, respectively. Still, the lipases in the CEE conserved their activity through most of solvents tested.

Among surfactants, incubation with SDS resulted in the condition that inhibited the lipase the most, with a loss of 96.2% in activity. It is possible that the addition of SDS promotes the disruption of hydrogen bonds that stabilize the native structure of the enzyme, causing a loss of functionality. A similar behavior has also been observed for the lipases of *Bacillus* sp.^[32], *Staphylococcus saprophyticus*^[35] and *Pseudomonas* spp.^[36]

3.6. Effect of temperature and pH on lipolytic activity

For the determination of the most suited conditions of pH and temperature for the action of this enzyme, the titration method with triolein as substrate was used. Initially, temperature was set at 37 °C and different pH values were evaluated. Figure 4A shows that the lipases act best under alkaline pH range, maintaining up to 50% of its maximum activity between pH 8.0 and 10.0. The peak of lipolytic activity (199.2 ± 12.7 U·gds⁻¹) was observed at pH 9.0, under the conditions tested. The lipases showed higher lipolytic activity in an alkaline pH range. Nevertheless, other works have also studied alkaline lipases. While lipases of *Chromohalobacter canadensis*^[30] and *Streptomyces violascens*^[34] presented better performance at pH 8.5 and 8.0, respectively, lipases produced by *Bacillus pumilus*^[15] performed better at pH 11.0. For the lipase of *Pseudomonas punonensis*,^[37] the highest activity was also observed for pH 9.0. Zhu et al.^[5] also produced an alkaline *Burkholderia gladioli* lipase, with highest activity at pH 8.5.

Following the same procedure to determine the best working temperature for the lipases obtained, the pH was set at 9.0 and different temperatures were evaluated (Figure 4B). The highest lipase activity (347.0 ± 14.5 U·gds⁻¹) was obtained at 50 °C, with the enzyme maintaining more than 50% of its maximum activity

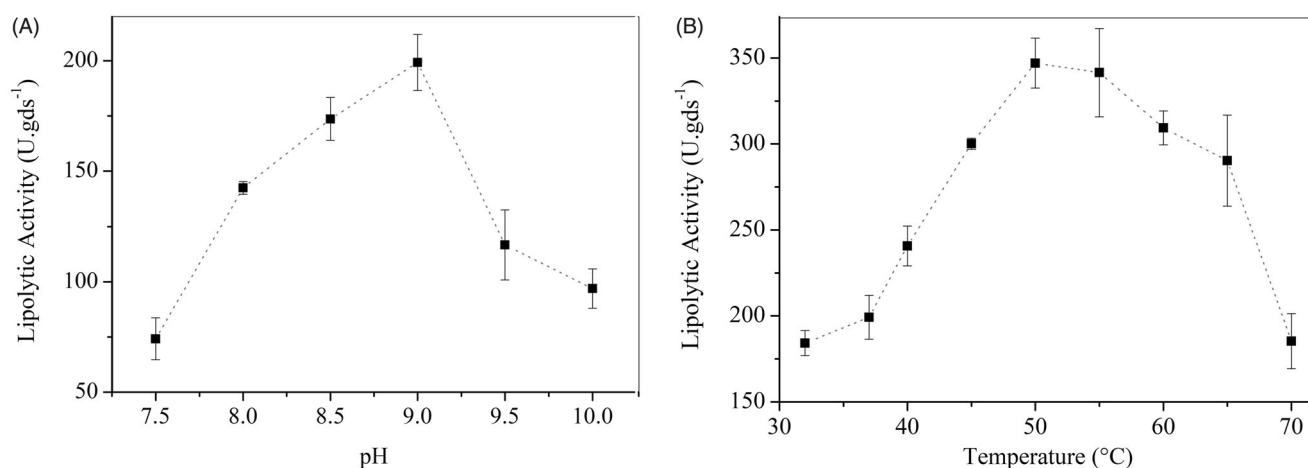


Figure 4. Effects of pH (A) and temperature (B) on the lipolytic activity of crude enzymatic extract of *Burkholderia gladioli* BRM58833. For the evaluation of the pH, the temperature was set at 37 °C. For the evaluation of the temperature, the pH was set at 9.0. Activities were determined by titrimetric method using triolein as substrate.

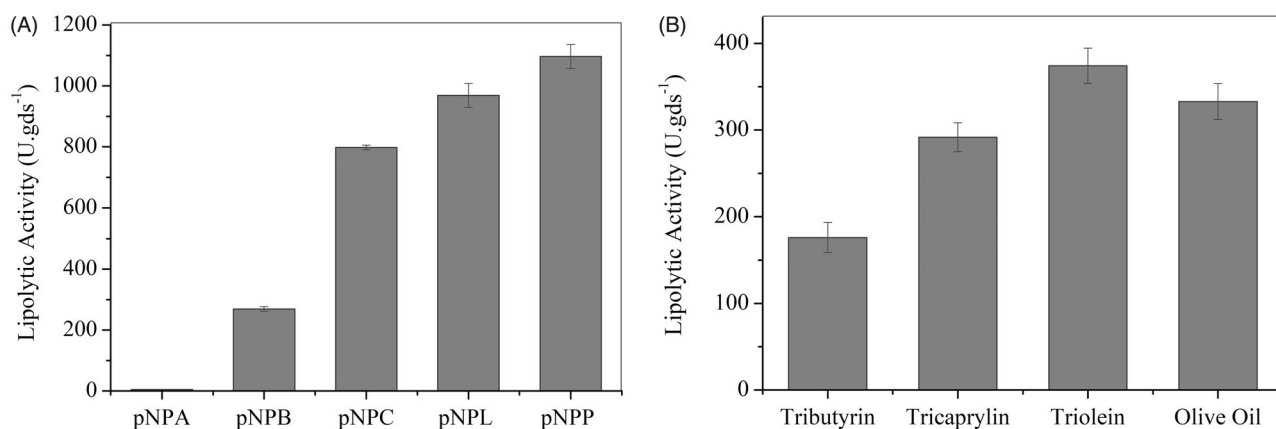


Figure 5. Lipolytic activity of crude enzymatic extract against synthetic (A) and natural (B) substrates. Activities were determined by the colorimetric method (A) at 37 °C and pH 7.0 and by the titrimetric method (B) at 50 °C and pH 9.0.

throughout the temperature range evaluated (32–70 °C). Even though the most used temperature in the literature for detection of lipolytic activity of microbial enzymes has been 37 °C, some authors have reported lipases that prefer higher temperatures, as we found in this work. While *Chromohalobacter canadensis* lipases^[30] exhibited optimal lipolytic activity at 55 °C, lipases of *Bacillus pumilus* performed better at 60 °C,^[15] under the conditions tested. Verma et al.^[38] reported a *Bacillus tequilensis* lipase with similar preferences for temperature and pH, exhibiting optimal activity at 60 °C and pH 9. Zhu et al.^[5] also reported a *Burkholderia gladioli* lipase with highest activity at 50 °C. However, when evaluated at 60 °C, that lipase showed only about 20% of its maximum activity.

3.7. Effect of substrate carbon-chain length on lipolytic activity

The lipolytic activity of the CEE was measured using natural and synthetic substrates of different chain lengths. The extract showed activity against all tested substrates with a preference for either synthetic or natural long carbon chains (Figure 5A,B). The highest lipolytic activities were

1096.7 ± 39.3 U·gds⁻¹ for pNPP and 374.2 ± 20.4 U·gds⁻¹ for triolein. The results obtained corroborate the secretome identifications, displaying the action true lipases present in the optimized extract.

3.8. Thermal stability

The CEE was thermally deactivated. As expected, a gradual decrease on catalytic activity was observed with temperature increase (Figure 6). CEE exhibited an expressive stability at 30 and 40 °C with a calculated half-life ($t_{1/2}$) of 109 and 65 h, respectively. At higher temperatures of 50, 60 and 70 °C, however, the denaturation of the lipase was more pronounced with half-lives of 4.8; 1.2 and 1.1 h, respectively. The time required to deactivate 50% of *B. gladioli* BRM58833 lipase initial activity is longer than that of alkaline lipase from *B. cepacia*^[39] of 54 min at 50 °C and 46 min at 60 °C and shorter than 3 h at 60 °C for *Bacillus tequilensis*.^[38] Stability and other catalytic properties are intrinsically related to structural factors at a molecular level.^[40] Since for industrial applications stability is required to improve cost-effectiveness, it remains a challenge to modulate these properties to obtain more stable enzymes.

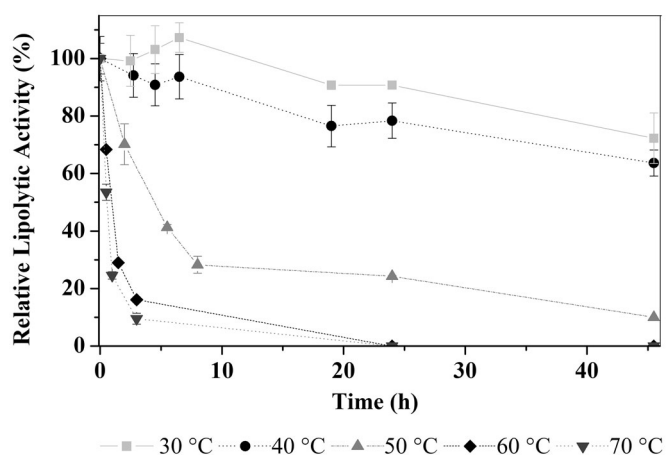


Figure 6. Effect of temperature on the crude lipolytic extract stability. Activities were determined by titration method using triolein as substrate at 50 °C and pH 9.0.

4. Conclusions

We have shown the first study of lipase production from *Burkholderia gladioli* by solid-state fermentation. The production of lipase was optimized, obtaining a 47% increase in lipolytic activity, which resulted in an extract with one of the highest lipolytic activities among the unpurified lipases produced by bacteria in solid state fermentation. The extract can be applied to a wide range of industrial applications as a crude and inexpensive extract without the need for purification. After characterization and determination of most suitable assay conditions, the lipolytic activity was 79% higher than initially. We obtained high activities values that are comparable to purified lipases. In addition, *B. gladioli* BRM58833 lipase showed high activity through extensive temperature and alkaline pH ranges and excellent solvent and temperature tolerance. Altogether, these findings demonstrate the potential of lipases obtained from the cultivation of *B. gladioli* BRM58833 as catalysts in both hydrolysis and ester synthesis processes.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The grant for this research [01.13.0315.02—DendePalm Project] was awarded by the Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI) via the Brazilian Innovation Agency (FINEP). A PhD scholarship was granted to Pedro A. Martins by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

ORCID

Thaís Fabiana Chan Salum  <http://orcid.org/0000-0001-8983-4703>

References

- [1] Bharathi, D.; Rajalakshmi, G.; Komathi, S. Optimization and Production of Lipase Enzyme from Bacterial Strains Isolated

from Petrol Spilled Soil. *J. King Saud Univ. Sci.* **2019**, *31*, 898–901. DOI: [10.1016/j.jksus.2017.12.018](https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.018).

- [2] Kovacic, F.; Babic, N.; Krauss, U.; Jaeger, K. E. Classification of Lipolytic Enzymes from Bacteria. In *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*; Rojo, F., Ed.; Springer, Cham, Berlin, 2019; pp. 1–35.
- [3] Ivancic, M.; Valinger, G.; Gruber, K.; Schwab, H. Inverting Enantioselectivity of *Burkholderia gladioli* Esterase EstB by Directed and Designed Evolution. *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 109–122. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2006.10.007](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.007).
- [4] Chen, L.; Kong, X.; Liang, Z.; Ye, F.; Yu, K.; Dai, W.; Wu, D.; Luo, C.; Jiang, H. Theoretical Study of the Mechanism of Proton Transfer in the Esterase EstB from *Burkholderia gladioli*. *J. Phys. Chem. B.* **2011**, *115*, 13019–131025. DOI: [10.1021/jp206297d](https://doi.org/10.1021/jp206297d).
- [5] Zhu, J.; Liu, Y.; Yan, Q.; Pan, L.; Li, Y.; Liang, G.; Wang, Q. Isolation and Characterization of a Novel Bacterium *Burkholderia gladioli* Bsp-1 Producing Alkaline Lipase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 1043–1052. DOI: [10.4014/jmb.1903.03045](https://doi.org/10.4014/jmb.1903.03045).
- [6] Mahapatra, P.; Kumari, A.; Garlapati, V. K.; Banerjee, R.; Nag, A. Optimization of Process Variables for Lipase Biosynthesis from *Rhizopus Oligosporus* Nrrl 5905 Using Evolutionary Operation Factorial Design Technique. *Indian J. Microbiol.* **2010**, *50*, 396–403. DOI: [10.1007/s12088-011-0071-z](https://doi.org/10.1007/s12088-011-0071-z).
- [7] Malilas, W.; Kang, S. W.; Kim, S. B.; Yoo, H. Y.; Chulalaksananukul, W.; Kim, S. W. Lipase from *Penicillium camembertii* KCCM 11268: Optimization of Solid State Fermentation and Application to Biodiesel Production. *Korean J. Chem. Eng.* **2013**, *30*, 405–412. DOI: [10.1007/s11814-012-0132-y](https://doi.org/10.1007/s11814-012-0132-y).
- [8] Salum, T. F. C.; Villeneuve, P.; Barea, B.; Yamamoto, C. I.; Côcco, L. C.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. Synthesis of Biodiesel in Column Fixed-Bed Bioreactor Using the Fermented Solid Produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Proc. Biochem.* **2010**, *45*, 1348–1354. DOI: [10.1016/j.procbio.2010.05.004](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.004).
- [9] Liu, Y.; Li, C.; Meng, X.; Yan, Y. Biodiesel Synthesis Directly Catalyzed by the Fermented Solid of *Burkholderia cenocepacia* via Solid-State Fermentation. *Fuel Process. Technol.* **2013**, *106*, 303–309. DOI: [10.1016/j.fuproc.2012.08.013](https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2012.08.013).
- [10] Winkler, U. K.; Stuckmann, M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **1979**, *138*, 663–670. DOI: [10.1128/JB.138.3.663-670.1979](https://doi.org/10.1128/JB.138.3.663-670.1979).
- [11] Diaz, J. C. M.; Rodriguez, J. A.; Roussos, S.; Cordova, J.; Abousalham, A.; Carriere, F.; Baratti, J. Lipase from the Thermotolerant Fungus *Rhizopus homothallicus* is More Thermostable When Produced Using Solid-State Fermentation than Liquid Fermentation Procedures. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 1042–1050. DOI: [10.1016/j.enzmictec.2006.02.005](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.005).
- [12] Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0).
- [13] Prim, N.; Sánchez, M.; Ruiz, C.; Javier Pastor, F. I.; Diaz, P. Use of Methylumbelliferyl-Derivative Substrates for Lipase Activity Characterization. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2003**, *22*, 339–346. DOI: [10.1016/S1381-1177\(03\)00048-1](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00048-1).
- [14] Silva, J. N.; Godoy, M. G.; Gutarra, M. L. E.; Freire, D. M. G. Impact of Extraction Parameters on the Recovery of Lipolytic Activity from Fermented Babassu Cake. *PLoS One.* **2014**, *9*, e103176–e103179. DOI: [10.1371/journal.pone.0103176](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103176).
- [15] Sangeetha, R.; Geetha, A.; Arulpandi, I. *Pongamia pinnata* Seed Cake: A Promising and Inexpensive Substrate for Production of Protease and Lipase from *Bacillus pumilus* SG2 on Solid-State Fermentation. *Indian J. Biochem. Biophys.* **2011**, *48*, 435–439.
- [16] Fernandes, M. L. M.; Saad, E. B.; Meira, J. A.; Ramos, L. P.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. Esterification and Transesterification Reactions Catalysed by Addition of Fermented Solids to Organic Reaction Media. *J. Mol. Catal. B* **2007**, *44*, 8–13. DOI: [10.1016/j.molcatb.2006.08.004](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.08.004).

- [17] Mahanta, N.; Gupta, A.; Khare, S. K. Production of Protease and Lipase by Solvent Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in Solid-State Fermentation Using *Jatropha curcas* Seed Cake as Substrate. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 1729–1735. DOI: [10.1016/j.biortech.2007.03.046](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.03.046).
- [18] Soares, D.; Pinto, A. F.; Gonçalves, A. G.; Mitchell, D. A.; Krieger, N. Biodiesel Production from Soybean Soapstock Acid Oil by Hydrolysis in Subcritical Water Followed by Lipase-Catalyzed Esterification Using a Fermented Solid in a Packed-Bed Reactor. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *81*, 15–23. DOI: [10.1016/j.bej.2013.09.017](https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.017).
- [19] Liu, Y.; Li, C.; Wang, S.; Chen, W. Solid-Supported Microorganism of *Burkholderia cenocepacia* Cultured via Solid-State Fermentation for Biodiesel Production: Optimization and Kinetics. *Appl. Energ.* **2014**, *113*, 713–721. DOI: [10.1016/j.apenergy.2013.08.009](https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.08.009).
- [20] Sahoo, R. K.; Subudhi, E.; Kumar, M. Quantitative Approach to Track Lipase Producing *Pseudomonas* sp. S1 in Nonsterilized Solid State Fermentation. *Let. Appl. Microbiol.* **2014**, *58*, 610–616. DOI: [10.1111/lam.12235](https://doi.org/10.1111/lam.12235).
- [21] Ananthi, S.; Prakash, S.; Glency Reefa, S. P.; Arthy, C.; Immanuel, G. Purification and Characterization of Lipase from *Shewanella* sp. CMST GISA-MSU Through Solid State Fermentation and Its Positional Specificity. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2016**, *7*, 1842–1856.
- [22] Mazhar, H.; Abbas, N.; Hussain, Z.; Ali, S. S. Extracellular Lipase Production from *Bacillus subtilis* Using Agro-Industrial Waste and Fruit Peels. *Punjab Univ. J. Zool.* **2016**, *31*, 261–267.
- [23] Musa, H.; Kasim, F. H.; Gunny, A. A. N.; Gopinath, S. C. B.; Ahmad, M. A. Biosecretion of Higher Halophilic Lipase by a Novel *Bacillus amyloliquefaciens* AIKK2 Using Agro-Waste as Supporting Substrate. *Process Biochem.* **2018**, *72*, 55–62. DOI: [10.1016/j.procbio.2018.06.022](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.022).
- [24] Sahoo, R. K.; Kumar, M.; Mohanty, S.; Sawyer, M.; Rahman, P. K. S. M.; Sukla, L. B.; Subudhi, E. Statistical Optimization for Lipase Production from Solid Waste of Vegetable Oil Industry. *Prep. Biochem. Biotech.* **2018**, *48*, 321–326. DOI: [10.1080/10826068.2018.1431785](https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1431785).
- [25] Zubairi, N. H. M.; Alam, M. Z.; Salleh, M. N.; Fazil, N. A. A New Isolate of Thermophilic and Organic Solvent Tolerant Bacteria for Lipase Production Using Basal Medium of Palm Kernel Cake. *Malays. J. Microbiol.* **2018**, *14*, 80–87.
- [26] Gagic, D.; Ciric, M.; Wen, W. X.; Ng, F.; Rakonjac, J. Exploring the Secretomes of Microbes and Microbial Communities Using Filamentous Phage Display. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 429.
- [27] Rosenau, F.; Tommassen, J.; Jaeger, K. E. Lipase-Specific Foldases. *Chembiochem* **2004**, *5*, 152–161. DOI: [10.1002/cbic.200300761](https://doi.org/10.1002/cbic.200300761).
- [28] Aguiéiras, E. C. G.; Cavalcanti-Oliveira, E. D.; Freire, D. M. G. Current Status and New Developments of Biodiesel Production Using Fungal Lipases. *Fuel* **2015**, *159*, 52–67. DOI: [10.1016/j.fuel.2015.06.064](https://doi.org/10.1016/j.fuel.2015.06.064).
- [29] Tisma, M.; Tadic, T.; Budzaki, S.; Ostojcic, M.; Salic, A.; Zelic, B.; Tran, N. N.; Ngothai, Y.; Hessel, V. Lipase Production by Solid-State Cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-Products from Cold-Pressing Oil Production. *Processes* **2019**, *7*, 465. DOI: [10.3390/pr7070465](https://doi.org/10.3390/pr7070465).
- [30] Ai, L.; Huang, Y.; Wang, C. Purification and Characterization of Halophilic Lipase of *Chromohalobacter* sp. from Ancient Salt Well. *J Basic Microbiol.* **2018**, *58*, 647–657. DOI: [10.1002/jobm.201800116](https://doi.org/10.1002/jobm.201800116).
- [31] Priyanka, P.; Kinsella, G. K.; Henehan, G. T.; Ryan, B. J. Isolation and Characterization of a Novel Thermo-Solvent-Stable Lipase from *Pseudomonas brenneri* and Its Application in Biodiesel Synthesis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *29*, 101806. DOI: [10.1016/j.bcab.2020.101806](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101806).
- [32] Esakkiraj, P.; Antonyraj, C. B.; Meleppat, B.; Ankaiah, D.; Ayyanna, R.; Ahamed, S. I. B.; Arul, V. Molecular Characterization and Application of Lipase from *Bacillus* sp. PU1 and Investigation of Structural Changes Based on pH and Temperature Using MD Simulation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 47–56. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.04.111](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.111).
- [33] Malekabadi, S.; Badoei-Dalfard, A.; Karami, Z. Biochemical Characterization of a Novel Col-Active, Halophilic and Organic-Tolerant Lipase from *B. licheniformis* KM12 with Potential Application for Biodiesel Production. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *109*, 389–398. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2017.11.173](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.173).
- [34] Boran, R.; Ugur, A.; Sarac, N.; Ceylan, O. Characterization of *Streptomyces violascens* OC125-8 Lipase for Oily Wastewater Treatment. *3 Biotech.* **2019**, *9*, 5. DOI: [10.1007/s13205-018-1539-x](https://doi.org/10.1007/s13205-018-1539-x).
- [35] Gricajeva, A.; Bikuté, I.; Kalėdienė, L. Atypical Organic-Solvent Tolerant Bacterial Hormone Sensitive Lipase-like Homologue EstAG1 from *Staphylococcus saprophyticus* AG1: synthesis and Characterization. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *130*, 253–265. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2019.02.110](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.110).
- [36] Ali, Y.; Ahmad, B.; Alghamdi, K. M.; Kamal, T.; Ali, H. S. H. M.; Anwar, Y.; Hussain, A.; Jomezai, N. U. Characterization of Recombinant Cold Active Lipase from a Novel *Pseudomonas* Spp. MG687270. *Int. J. Agric. Biol.* **2019**, *22*, 855–865.
- [37] Sonkar, K.; Singh, D. P. Biochemical Characterization and Thermodynamic Study of Lipase from Psychrotolerant *Pseudomonas punonensis*. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *28*, 101686. DOI: [10.1016/j.bcab.2020.101686](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101686).
- [38] Verma, S.; Kumar, R.; Kumar, P.; Sharma, D.; Gahlot, H.; Sharma, P. K.; Meghwanshi, G. K. Cloning, Characterization, and Structural Modeling of an Extremophilic Bacterial Lipase Isolated from Saline Habitats of the Thar Desert. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2020**, *192*, 557–572. DOI: [10.1007/s12010-020-03329-3](https://doi.org/10.1007/s12010-020-03329-3).
- [39] Dalal, S.; Singh, P. K.; Raghava, S.; Rawat, S.; Gupta, M. N. Purification and Properties of the Alkaline Lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25609. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2008**, *51*, 23–31.
- [40] Chen, H.; Meng, X.; Xu, X.; Liu, W.; Li, S. The Molecular Basis for Lipase Stereoselectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 3487–3495. DOI: [10.1007/s00253-018-8858-z](https://doi.org/10.1007/s00253-018-8858-z).

ANEXO III – Secretoma de *Burkholderia gladioli* BRM58833 quando cultivada em farelo de trigo e óleo de soja por fermentação em estado sólido.

Raw MS_Ids

FDR Conf.	RefSeq (NCBI)	Protein name	Sum PEP Score	Cov.	#Pep	#PSMs	#Uniq.Pep.	# AAs	MW [kDa]	calc. pl	emPAI	Score SequestHT	#Pep. SequestHT
High	WP_017921333.1	Catalase C	82,93283143	44,64	22	27	22	699	76,168	6,39	3,024	109,5699141	22
High	WP_165652260.1	putative lipoprotein YfhM	59,8158989	13,96	19	20	19	2041	218,234	6,51	0,445	74,90800524	19
High	WP_017920870.1	Aminopeptidase N	79,28863998	39,5	19	24	19	714	77,999	5,94	3,453	98,06331468	19
High	WP_013698945.1	6-phosphogluconolactonase	92,05300847	52,24	17	28	17	402	43,215	7,37	6,43	114,5632476	17
High	WP_013697881.1	D-allose-binding periplasmic protein	71,25825899	64,15	17	20	17	318	33,659	9,03	6,406	91,36664128	17
High	WP_165651580.1	putative 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	65,47331245	28,11	17	21	17	811	87,589	7,11	1,49	74,69780076	17
High	WP_165651251.1	60 kDa chaperonin	92,76271591	43,41	20	33	16	546	56,987	5,17	6,565	130,4829249	20
High	WP_013698203.1	Putrescine-binding periplasmic protein	74,99210901	58,52	16	24	16	364	40,001	8,79	13,125	94,29686415	16
High	WP_165652285.1	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and al	76,59271045	52,08	15	25	15	384	40,257	8,46	9	101,4300671	15
High	WP_165651940.1	Thermostable beta-glucosidase B	73,89940872	34,24	15	19	15	736	78,603	6,27	1,703	84,8156023	15
High	WP_013696724.1	Chaperone protein DnaK	83,00260677	28,09	14	21	14	648	69,67	5,03	2,162	111,1787398	14
High	WP_165651386.1	hypothetical protein	99,22663281	38,97	14	24	14	580	62,807	5,83	6,667	112,8115442	14
High	WP_165651290.1	Glutamate/aspartate import solute-binding pro	48,51730871	45,12	14	19	14	297	32,503	8,91	5,579	67,63062382	14
High	WP_013690982.1	Sulfoacetaldehyde dehydrogenase	49,5708366	33,89	13	16	13	478	51,823	6,01	2,047	62,17626619	13
High	WP_165651720.1	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and al	69,65119089	55,41	12	20	12	379	40,15	8,66	7,031	92,08589947	12
High	WP_013690597.1	Malate dehydrogenase	53,76908148	54,43	12	23	12	327	34,951	6,01	3,962	94,78974497	12
High	WP_013689280.1	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit beta	39,0140684	23,57	12	12	12	751	79,138	7,59	0,848	45,85386276	12
High	WP_017921369.1	Periplasmic dipeptide transport protein	30,56008275	23,98	11	11	11	538	59,724	8,56	1,395	32,47207475	11
High	WP_017921495.1	Putative formate dehydrogenase	32,21213072	11,61	11	12	11	982	106,734	6,23	0,624	39,01727998	11
High	WP_013698717.1	Enolase	85,57208102	43,56	10	18	10	427	45,672	4,88	4,248	101,7714801	10
High	WP_165651466.1	Transaldolase	26,02016884	39,43	10	12	10	317	34,939	5,39	1,873	38,16211271	10
High	WP_165651042.1	Catalase	43,45583917	32,09	10	14	10	511	56,869	6,71	1,548	57,96932912	10
High	WP_017919501.1	Aminopeptidase N	26,99003109	11,78	10	12	10	900	99,841	5,48	0,668	38,80316782	10
High	WP_017919041.1	Aldose 1-epimerase	34,62524216	44,22	10	11	10	389	41,543	7,01	2,34	46,42807794	10
High	WP_165651222.1	putative sugar-binding periplasmic protein	29,51828474	31,08	10	10	10	415	44,224	8,54	1,424	35,04533601	10
High	WP_017920543.1	Glycine betaine-binding protein YehZ	42,9088878	52,81	10	13	10	320	33,353	8,91	4,275	51,18692625	10
High	WP_165650827.1	Isocitrate lyase	51,36318671	25,06	9	19	9	435	47,806	6,21	3,365	77,98558629	9
High	WP_013698879.1	Ketol-acid reductoisomerase (NADP(+))	44,12941075	44,97	9	11	9	338	36,273	6,46	1,873	49,5874691	9
High	WP_017918825.1	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	32,09608288	10,77	9	10	9	1356	145,313	5,55	0,338	46,84773874	9
High	WP_165651732.1	Beta-galactosidase BoGH2A	42,82113194	6,364	9	11	9	2404	255,401	5,14	0,389	49,48990917	9
High	WP_017918286.1	Chitin-binding protein CbpD	42,73507821	64,8	9	12	9	250	26,938	8,07	6,197	51,70983672	9
High	WP_017919959.1	Putative 3-oxopropanoate dehydrogenase	34,96281367	24,85	9	12	9	503	54,472	6,33	1,395	48,41517448	9
High	WP_013699041.1	Inorganic pyrophosphatase	44,3612273	47,43	8	12	8	175	19,142	5,24	9	48,58194423	8
High	WP_165650516.1	Histidine-binding periplasmic protein	38,35914496	46,79	8	14	8	265	28,134	9,03	2,875	63,5607214	8
High	WP_165651550.1	Fructose-bisphosphate aldolase	29,49292502	31,07	8	11	8	354	38,611	6,35	2,34	38,91272604	8
High	WP_017920953.1	Malate synthase A	32,92279873	21,13	8	11	8	530	59,427	6,02	1,154	39,83522773	8
High	WP_013696606.1	L-arabinose-binding periplasmic protein	37,33338699	37,76	8	10	8	331	35,036	8,92	1,848	44,2633028	8
High	WP_165651227.1	General stress protein 18	32,84239999	58,59	8	10	8	227	24,425	5,25	3,642	40,44558191	8
High	WP_013690287.1	hypothetical protein	53,05381753	34,2	8	15	8	307	32,806	8,27	6,356	67,48222625	8
High	WP_017920210.1	Dipeptidyl aminopeptidase BII	22,71050473	13,97	8	9	8	730	80,294	6,55	0,501	30,66002512	8
High	WP_165650955.1	3-keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme	42,4313034	21,93	8	11	8	538	58,636	6,39	1,649	53,84604239	8

High	WP_017918805.1	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-	53,49366154	60,23	7	18	7	176	18,851	5,86	20,544	82,60516953	7
High	WP_013698592.1	Aspartate kinase	28,50214035	23,8	7	8	7	416	44,681	5,44	0,978	31,50995159	7
High	WP_165651294.1	Phosphogluconate dehydratase	26,06574486	16,59	7	8	7	621	65,267	6,46	0,812	34,07301736	7
High	WP_165651368.1	Gamma-glutamyltranspeptidase	17,29814352	16,73	7	7	7	562	60,108	7,2	0,655	22,84329224	7
High	WP_017921595.1	Leucine--tRNA ligase	30,01679035	12,04	7	8	7	864	96,123	5,6	0,366	33,05251896	7
High	WP_165651865.1	Catalase-peroxidase	14,47589395	10,53	7	8	7	712	77,222	5,62	0,442	25,87400293	7
High	WP_013699217.1	Erythritol/L-threitol-binding protein	50,78539376	24,43	7	12	7	442	47,793	8,63	1,783	50,32529449	7
High	WP_013696689.1	Protein Ycel	35,16329194	42,19	7	9	7	192	20,603	6,87	5,579	47,04290867	7
High	WP_165652274.1	Quinoprotein glucose dehydrogenase	22,03404648	14,98	7	7	7	841	89,01	6,49	0,546	26,58273792	7
High	WP_017919316.1	Lysine/arginine/ornithine-binding periplasmic p	34,42929629	35,85	7	8	7	265	28,201	9,19	2,415	36,16625547	7
High	WP_165651938.1	Periplasmic oligopeptide-binding protein	15,51354589	15,06	7	7	7	538	60,078	8,4	0,682	21,38356447	7
High	WP_013691573.1	Lysine/arginine/ornithine-binding periplasmic p	27,68403942	35,77	7	8	7	260	27,95	8,53	1,637	30,90278411	7
High	WP_013697788.1	Dihydropolypol dehydrogenase	34,44736768	17,23	7	11	7	476	50,227	6,35	1,207	47,0966146	7
High	WP_013699309.1	D-galactonate dehydratase	39,49595843	35,08	7	10	7	382	42,359	5,78	2,594	46,34811115	7
High	WP_017920341.1	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase	41,28963289	90,12	7	9	7	172	18,742	3,99	12,335	42,56265545	7
High	WP_013696773.1	Dipeptidyl-peptidase 5	26,17650757	22,63	6	6	6	433	45,596	9,39	0,738	24,32167006	6
High	WP_017919847.1	Carbonic anhydrase 2	28,8558147	33,85	6	9	6	257	28,558	6,34	2,728	38,60735846	6
High	WP_165651189.1	NADP-reducing hydrogenase subunit HndC	27,76825703	19,66	6	8	6	524	55,077	5,96	0,978	35,1982038	6
High	WP_165652138.1	Lipase	28,44387719	24,58	6	8	6	358	36,825	7,64	4,337	32,32618284	6
High	WP_165651753.1	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	22,35728286	24,66	6	7	6	365	41,134	5,71	1,154	26,69999838	6
High	WP_017918208.1	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase	22,87885115	26,33	6	8	6	300	31,725	6,62	1,783	30,80643368	6
High	WP_017920207.1	Aconitate isomerase	29,09327304	34,19	6	7	6	272	27,755	8,32	1,738	28,5218308	6
High	WP_165651636.1	Arginine--tRNA ligase	21,05339034	14,81	6	8	6	594	64,493	5,9	0,528	30,69373381	6
High	WP_165650610.1	Elongation factor Tu	25,20139788	17,17	6	8	6	396	43,201	5,39	1,154	28,39692163	6
High	WP_013698837.1	hypothetical protein	23,60052943	22,45	6	7	6	383	43,158	5,22	1,081	29,40522718	6
High	WP_013691098.1	Succinyl-diaminopimelate desuccinylase	30,61745499	16,36	6	8	6	483	52,242	5,38	1,089	32,58730316	6
High	WP_017921437.1	hypothetical protein	25,63813858	88,42	6	8	6	95	10,532	6,28	99	34,71662807	6
High	WP_017920753.1	Protein Ycel	22,81533066	41,4	6	7	6	186	19,569	9,04	1,929	26,66258872	6
High	WP_165651300.1	NADP-dependent malic enzyme	20,91011217	9,53	6	7	6	766	83,002	5,81	0,585	23,90941477	6
High	WP_013698491.1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	31,48485057	20,58	6	9	6	486	51,849	7,59	0,84	32,73173022	6
High	WP_013696951.1	hypothetical protein	27,3858054	26,38	6	8	6	307	33,966	5,5	1,089	27,54808569	6
High	WP_017920800.1	Superoxide dismutase [Fe]	33,34856635	58,85	6	7	6	192	21,125	5,94	9	34,89830494	6
High	WP_013699350.1	3-methylmercaptopyruvate-CoA dehydrogenase	23,35431829	13,78	6	7	6	595	65,12	5,91	0,607	26,38535285	6
High	WP_013697368.1	Phosphate-binding protein PstS	20,16435733	29,45	6	7	6	343	36,119	8,73	1,015	26,07286525	6
High	WP_013696292.1	Adenosylhomocysteinase	14,39283051	16,1	6	6	6	472	52,075	6,15	0,61	18,40568995	6
High	WP_012734444.1	Stringent starvation protein A	32,32520884	42,86	6	10	6	203	23,678	6,93	4,878	42,58449578	6
High	WP_013699445.1	D-methionine-binding lipoprotein MetQ	27,44744715	35,42	6	7	6	271	29,024	9,51	1,929	30,60525179	6
High	WP_013699704.1	S-adenosylmethionine synthase	33,95288954	24,11	6	10	6	394	42,5	5,34	1,462	43,26191115	6
High	WP_017919083.1	Glucose-6-phosphate isomerase	23,09058377	13,33	6	7	6	540	58,843	6,3	0,743	29,32112098	6
High	WP_013699339.1	Chaperone SurA	30,39654372	21,73	6	9	6	451	48,72	6,99	0,812	42,71550226	6
High	WP_013698870.1	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	18,04841674	11,8	6	7	6	712	76,435	5,5	0,468	22,21718717	6
High	WP_013696991.1	Outer membrane protein A	32,40608207	26,15	6	45	6	218	23,477	9,36	4,179	155,112132	6
High	WP_013698262.1	Thioredoxin 1	22,20019693	68,52	6	10	6	108	11,85	5,91	6,743	34,01611996	6
High	WP_165651474.1	hypothetical protein	22,1012141	54,29	5	11	5	140	14,833	7,02	12,895	44,76528406	5

High	WP_013690957.1	hypothetical protein	24,81189004	48,21	5	9	5	195	19,714	9,64	3,642	36,43031764	5
High	WP_017919016.1	Dipeptidyl aminopeptidase BIII	18,19045466	12,38	5	5	5	630	71,138	5,27	0,403	20,01481581	5
High	WP_165650862.1	Lon protease	18,42002275	8,447	5	6	5	805	88,942	6,58	0,298	21,41337156	5
High	WP_013696510.1	hypothetical protein	15,67810574	17,05	5	5	5	563	61,457	6,46	0,433	20,66241157	5
High	WP_017920588.1	Thioredoxin reductase	22,52692613	29,06	5	6	5	320	34,297	5,63	1,371	29,51153588	5
High	WP_017920320.1	Glycine dehydrogenase (decarboxylating)	19,94020499	7,889	5	6	5	976	104,165	6,23	0,35	25,74422789	5
High	WP_013697190.1	Putative peroxiredoxin bcp	14,43141194	34,07	5	5	5	182	19,604	8,34	1,424	16,43198657	5
High	WP_017920714.1	putative fatty acid methyltransferase	16,2160486	18,47	5	5	5	406	45,982	6,04	0,557	19,32877421	5
High	WP_013689110.1	Linocin-M18	27,39567229	37,27	5	6	5	271	29,059	5	1,512	26,04570818	5
High	WP_017920621.1	hypothetical protein	23,99530137	39,33	5	5	5	267	29,299	5,49	0,968	24,88395643	5
High	WP_036038260.1	Leucine-, isoleucine-, valine-, threonine-, and al	20,3304794	20,53	5	6	5	380	40,015	8,24	0,931	23,69427657	5
High	WP_013698868.1	Triosephosphate isomerase	35,56354149	49,4	5	9	5	251	26,166	6,13	4,623	43,69371462	5
High	WP_017919485.1	Penicillin acylase 2	38,74335788	12,58	5	8	5	787	84,504	6,74	0,567	39,73026514	5
High	WP_013698604.1	Inositol-1-monophosphatase	21,31755146	25,56	5	6	5	270	29,707	5,68	1,254	25,6543498	5
High	WP_165650568.1	hypothetical protein	19,69760405	12,37	5	8	5	558	60,347	5,81	0,905	29,71982098	5
High	WP_013690079.1	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	20,47276319	37,43	5	8	5	187	20,487	5,11	2,455	27,24948764	5
High	WP_165650969.1	Urocanate hydratase	17,46687027	10,5	5	6	5	562	61,613	6,29	0,668	20,362324	5
High	WP_017919529.1	hypothetical protein	14,62613814	18,12	5	5	5	425	45,34	9,17	0,532	21,27570903	5
High	WP_017919007.1	D-threitol-binding protein	20,54041188	24,29	5	6	5	317	32,592	9,01	1,154	25,95605016	5
High	WP_013690059.1	Solute-binding protein	15,06236187	20,3	5	5	5	330	36,374	8,78	0,778	15,91074347	5
High	WP_165650892.1	Zinc-type alcohol dehydrogenase-like protein	17,12150764	32,25	5	5	5	338	35,944	6,46	0,778	25,16036606	5
High	WP_017918954.1	hypothetical protein	22,19617123	9,184	5	5	5	882	93,55	6,13	0,299	22,22420645	5
High	WP_013689993.1	Beta-lactamase Toho-1	16,1246967	26,64	5	5	5	304	32,051	8,85	0,73	18,08867931	5
High	WP_165650518.1	hypothetical protein	15,29249301	8,638	5	6	5	903	97,896	6,96	0,264	20,97722721	5
High	WP_165650625.1	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic pr	16,4235148	17,46	5	5	5	441	48,146	9,19	0,468	17,93264794	5
High	WP_013699532.1	Thiol:disulfide interchange protein DsbA	21,86814273	36,62	5	7	5	213	23,462	8,59	2,455	25,87492609	5
High	WP_013690599.1	hypothetical protein	19,83264419	33,71	5	9	5	175	18,379	9,74	4,995	34,4628036	5
High	WP_165651544.1	Multidrug efflux pump subunit AcrB	16,53724363	5,644	5	6	5	1063	114,261	6,62	0,389	23,52006245	5
High	WP_013698368.1	2-C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate s	12,2806874	40,37	5	5	5	161	17,089	6,39	2,594	22,29221582	5
High	WP_165650985.1	hypothetical protein	24,74061931	13,28	5	6	5	640	73,429	5,66	0,359	28,20956016	5
High	WP_013696356.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	13,38376603	5,423	5	5	5	1420	157,017	6,79	0,119	18,14384151	5
High	WP_013699474.1	Glutathione synthetase	17,44595504	18,87	5	5	5	318	34,664	5,47	0,833	20,55365539	5
High	WP_165651545.1	Multidrug resistance protein MexA	16,53029545	18,43	5	5	5	434	44,516	9,11	0,65	18,89277422	5
High	WP_165651613.1	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphogl	10,40188122	22,98	5	5	5	248	27,971	6,32	1,054	15,98311186	5
High	WP_017918757.1	DNA gyrase subunit A	19,7156921	8,381	5	6	5	871	96,614	5,33	0,311	20,65467072	5
High	WP_006398175.1	Nitrogen regulatory protein P-II	24,75667797	48,21	4	5	4	112	12,138	6,13	4,179	25,48593163	4
High	WP_017919207.1	PE-PGRS family protein PE_PGRS18	15,29014363	15,96	4	6	4	332	35,889	9,2	0,995	20,70763659	4
High	WP_013698224.1	Acetoacetyl-CoA reductase	17,99352271	22,36	4	5	4	246	26,236	6,93	1,276	20,55665088	4
High	WP_165651292.1	Adenylosuccinate lyase	10,75898532	10,17	4	4	4	462	51,451	6,38	0,374	11,91982651	4
High	WP_043216221.1	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	19,45303379	16,72	4	5	4	341	37,96	6,34	0,73	25,06501746	4
High	WP_017920516.1	hypothetical protein	13,06967302	8,217	4	4	4	645	66,96	5,94	0,311	14,31054616	4
High	WP_017919720.1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	20,39493312	20,48	4	5	4	332	36,792	5,48	1,154	20,8801899	4
High	WP_013698173.1	hypothetical protein	14,34821663	32,04	4	7	4	181	19,106	9,14	2,594	25,20917439	4
High	WP_165651157.1	N-succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrog	10,9448637	11,91	4	4	4	487	51,661	6,18	0,445	13,92041612	4

High	WP_013698976.1	DNA topoisomerase 4 subunit A	13,81155398	6,848	4	5	4	774	84,076	6,65	0,271	22,17360616	4
High	WP_013698824.1	34 kDa membrane antigen	32,04290802	31,69	4	10	4	183	19,786	6,7	9	44,70342851	4
High	WP_017920707.1	Nitronate monooxygenase	26,13983833	27,59	4	5	4	319	34,001	6,32	0,968	29,60561419	4
High	WP_017919845.1	Periplasmic dipeptide transport protein	8,335853314	7,129	4	4	4	533	58,016	8,27	0,407	11,86334825	4
High	WP_017921802.1	Histidine ammonia-lyase	11,71639094	7,89	4	4	4	507	53,143	6,05	0,359	14,62609482	4
High	WP_165651179.1	Metalloprotease PmbA	9,118947032	14,25	4	4	4	456	48,922	6,27	0,425	13,47352481	4
High	WP_017919837.1	General stress protein 69	14,17024561	18,04	4	4	4	316	34,262	5,49	0,719	14,87567973	4
High	WP_165651667.1	Ferredoxin--NADP reductase	18,43069246	18,36	4	7	4	256	28,678	5,62	1,336	29,71799803	4
High	WP_013697753.1	Putative aminoacrylate peracid reductase RutC	29,90354385	51,28	4	8	4	117	12,688	5,39	9	36,05875325	4
High	WP_013696712.1	Metalloprotease TldD	13,58189191	11,27	4	4	4	488	51,45	5,48	0,292	14,62612057	4
High	WP_017921204.1	Cell division coordinator CpoB	14,96919509	24,5	4	5	4	249	27,133	8,97	1,154	21,38496947	4
High	WP_017920763.1	Glucose 1-dehydrogenase 1	11,42099208	25	4	4	4	248	24,889	5,4	0,931	14,52809095	4
High	WP_013696623.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	6,77394506	15,77	4	4	4	336	36,342	6,76	0,585	9,884430647	4
High	WP_013699562.1	Sulfate-binding protein	10,36903148	21,83	4	4	4	339	36,997	8,24	0,668	16,8661015	4
High	WP_013697715.1	Ribose import binding protein RbsB	8,092842833	16,76	4	4	4	358	38,14	9,16	0,585	12,9078095	4
High	WP_165650786.1	D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase	18,20724048	30,53	4	4	4	262	27,496	6,15	0,931	19,7564187	4
High	WP_165652262.1	hypothetical protein	12,68205715	12,96	4	4	4	733	77,561	5,78	0,334	18,85682654	4
High	WP_165651374.1	Chitosanase	30,15918075	16,35	4	8	4	373	39,606	7,72	1,228	36,00797129	4
High	WP_165651611.1	Cytochrome c oxidase subunit 2	16,98966577	10,99	4	6	4	537	56,524	7,34	0,54	23,96611786	4
High	WP_013699405.1	Lipopolysaccharide export system protein LptA	20,25236082	26,58	4	6	4	222	23,513	8,32	1,276	28,46499515	4
High	WP_013689260.1	3-oxoadipate enol-lactonase 2	23,79847894	15,81	4	7	4	291	32,309	6,77	1,738	33,24897051	4
High	WP_165651534.1	hypothetical protein	11,20476311	23,6	4	4	4	161	18,048	9,04	1,512	14,89642406	4
High	WP_013690606.1	Murein hydrolase activator NlpD	10,86965978	22,09	4	4	4	258	26,682	9,54	0,931	15,12812781	4
High	WP_013698310.1	hypothetical protein	24,08114728	39,49	4	9	4	195	19,751	9,54	4,623	39,49736738	4
High	WP_013696332.1	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase	11,04155575	17,14	4	4	4	315	34,198	5,95	0,668	14,99550915	4
High	WP_165651467.1	Chaperone protein HtpG	19,46922716	7,437	4	5	4	632	71,314	5,15	0,354	20,49893069	4
High	WP_013696424.1	putative phospholipid-binding protein MlaC	7,327144082	19,23	4	4	4	208	23,499	9,61	0,931	7,734597445	4
High	WP_165651633.1	hypothetical protein	10,91949413	13,64	4	5	4	330	35,973	5,59	1,054	16,07267261	4
High	WP_017920414.1	Putative xanthine dehydrogenase YagR molybd	21,48641102	11,44	4	5	4	743	79,321	7,31	0,307	27,25049543	4
High	WP_013699058.1	putative lipoprotein YiaD	17,27331324	32,41	4	5	4	216	21,452	9,91	2,594	21,72369099	4
High	WP_013698343.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	14,33528569	13,62	4	5	4	646	69,667	6,35	0,299	15,15276968	4
High	WP_165650775.1	Exo-beta-1,3-glucanase	15,32146971	13,31	4	5	4	616	64,248	6,46	0,778	23,00086164	4
High	WP_165651643.1	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase A	11,67168999	15,72	4	4	4	318	34,723	6,47	0,551	15,26467156	4
High	WP_165650787.1	Bacterioferritin	14,56285653	34,18	4	4	4	158	18,415	4,97	1,31	16,96911621	4
High	WP_043218385.1	Bifunctional purine biosynthesis protein PurH	18,57948888	11,71	4	4	4	521	55,338	6,02	0,389	17,99734187	4
High	WP_013699589.1	Bifunctional protein GlmU	14,95077779	14,35	4	5	4	453	47,61	5,85	0,65	21,46168327	4
High	WP_165651278.1	DNA protection during starvation protein 1	21,80250334	38,89	4	5	4	162	18,044	6,09	2,162	21,47848439	4
High	WP_013696155.1	hypothetical protein	19,21976161	19,7	4	5	4	401	43,085	8,69	0,65	24,32651734	4
High	WP_013697082.1	Periplasmic pH-dependent serine endoprotease	13,16733996	11,11	4	4	4	513	53,238	6,27	0,359	14,77140117	4
High	WP_036052013.1	hypothetical protein	39,35758197	46,9	4	12	4	258	26,346	5	18,307	71,53177261	4
High	WP_013698225.1	Acetyl-CoA acetyltransferase	13,30210831	18,07	4	4	4	393	40,526	7,09	0,52	18,51729012	4
High	WP_165650571.1	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP	24,25525737	11,74	3	5	3	511	53,835	5,68	0,468	26,76543808	3
High	WP_013698730.1	hypothetical protein	6,017391613	45,59	3	3	3	68	8,047	4,32	4,623	10,44156933	3
High	WP_165650585.1	Multiple sugar-binding protein	5,445756606	10,71	3	3	3	420	46,267	8,37	0,304	9,726813793	3

High	WP_165652137.1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarbox	9,078585192	5,957	3	3	3	470	51,127	6,33	0,28	12,09958148	3
High	WP_013699377.1	hypothetical protein	17,09573235	29,17	3	7	3	144	14,925	7,69	3,217	27,31019592	3
High	WP_013699348.1	3-ketoacyl-CoA thiolase	9,729525345	11,03	3	3	3	399	42	6,44	0,318	7,265222073	3
High	WP_165651725.1	Cytochrome c-555	15,68849408	14,42	3	4	3	312	30,544	7,46	0,624	17,81847477	3
High	WP_017921265.1	Cytosine deaminase	9,877221087	10,59	3	3	3	425	46,901	6,3	0,304	12,69650555	3
High	WP_098153825.1	Oligopeptidase A	16,94964769	7,317	3	4	3	697	77,266	5,26	0,292	18,50086522	3
High	WP_013698349.1	Trigger factor	6,6459666	9,375	3	3	3	448	49,518	5,06	0,241	6,622646809	3
High	WP_013696529.1	Ribulose-phosphate 3-epimerase	15,74497267	25	3	4	3	228	24,86	6,38	1,31	19,85922265	3
High	WP_013697876.1	Sulfate-binding protein	8,020582133	14,24	3	3	3	344	37,444	9,23	0,389	10,98936486	3
High	WP_165650852.1	Penicillin-binding protein 1A	7,921946342	6,198	3	3	3	839	91,599	7,03	0,155	10,62803936	3
High	WP_013699180.1	putative oxidoreductase	8,704794644	20,63	3	3	3	252	25,808	6,21	0,54	11,62247968	3
High	WP_165651710.1	Leu/Ile/Val-binding protein	6,524800232	9,487	3	3	3	390	40,864	9,44	0,369	9,391790867	3
High	WP_013690311.1	Acyl-CoA dehydrogenase, short-chain specific	12,0574485	17,3	3	3	3	393	42,62	6,04	0,334	14,56984973	3
High	WP_165650716.1	Dihydropolpyl dehydrogenase	17,0125291	6,237	3	5	3	465	48,624	6,89	0,487	21,59110761	3
High	WP_017919781.1	hypothetical protein	13,1670614	25,58	3	6	3	172	18,528	8,15	1,848	19,01204133	3
High	WP_017921051.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component	7,525114321	4,12	3	3	3	898	100,693	5,83	0,131	9,139163733	3
High	WP_013691722.1	putative phospholipid-binding lipoprotein MlaA	8,927873242	12,22	3	3	3	311	31,721	6,95	0,701	11,92132878	3
High	WP_017919834.1	hypothetical protein	16,09540273	27,87	3	4	3	183	19,357	8,18	1,783	16,56868792	3
High	WP_165651428.1	hypothetical protein	14,15174333	12,69	3	4	3	323	35,983	5,58	0,668	14,11646366	3
High	WP_017919991.1	Autoinducer 2-binding protein LsrB	30,19380974	20,91	3	8	3	330	34,741	8,15	1,336	43,8976059	3
High	WP_013689950.1	hypothetical protein	8,977681654	22,71	3	3	3	229	24,094	8,68	0,778	10,8591969	3
High	WP_013698334.1	putative parvulin-type peptidyl-prolyl cis-trans	13,3996242	17,37	3	4	3	259	28,655	8,25	0,624	17,56379986	3
High	WP_013691634.1	hypothetical protein	15,2164092	48,31	3	4	3	89	9,59	5,45	3,642	15,75001097	3
High	WP_013698745.1	Dihydropolpyl dehydrogenase	14,03632813	9,764	4	4	3	594	62,422	5,57	0,283	17,68772912	4
High	WP_013690103.1	Proline iminopeptidase	7,407725685	13,5	3	3	3	311	34,7	6,11	0,389	7,022946954	3
High	WP_017920759.1	hypothetical protein	13,71088575	6,152	3	5	3	699	74,071	5,27	0,65	19,91696024	3
High	WP_013689318.1	hypothetical protein	9,807060442	22,19	3	3	3	302	32,093	9,25	0,995	14,10565686	3
High	WP_013698541.1	hypothetical protein	8,836823801	42,7	3	3	3	89	9,812	4,93	1,683	12,02120948	3
High	WP_017917924.1	ATP synthase subunit beta 1	9,66409238	9,914	3	3	3	464	50,505	5,34	0,318	11,23960209	3
High	WP_013697021.1	hypothetical protein	11,43551715	11,97	3	4	3	401	43,68	8,6	0,492	15,49365926	3
High	WP_020381344.1	Octopine-binding periplasmic protein	21,26298408	18,44	3	5	3	282	29,968	8,79	0,968	22,64670682	3
High	WP_017919987.1	L-ribulose 3-epimerase	10,31489902	13,13	3	4	3	297	32,143	5,76	0,54	14,12440538	3
High	WP_165651139.1	Catalase	10,09909697	10,06	3	3	3	487	55,065	7,06	0,25	10,66794646	3
High	WP_013698327.1	Nicotinamidase	9,606096887	20,29	3	3	3	207	22,179	5,1	0,874	12,75503445	3
High	WP_017919046.1	Ureidoglycolate lyase	8,16264615	17,38	3	3	3	282	30,454	5,36	0,585	11,06001377	3
High	WP_013697979.1	hypothetical protein	12,95765736	16,2	3	5	3	142	15,22	5,12	1,848	18,72633719	3
High	WP_017920259.1	Glutamine-binding periplasmic protein	8,545047704	14,79	3	3	3	257	27,66	9,16	0,438	10,73318791	3
High	WP_165651549.1	Esterase EstA	11,28678355	19,53	3	3	3	379	38,331	6,27	1,371	13,48942757	3
High	WP_165651392.1	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	7,56008858	9,823	3	3	3	509	53,778	6,09	0,269	10,76921177	3
High	WP_013689495.1	hypothetical protein	9,248868109	21,23	3	3	3	292	31,215	8,07	0,54	9,172760487	3
High	WP_013688834.1	Glucarate dehydratase	7,407764428	9,8	3	4	3	449	48,883	5,81	0,389	16,03493571	3
High	WP_165652224.1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	11,20283858	7,487	3	4	3	561	61,677	5,69	0,274	13,6950984	3
High	WP_013698503.1	Acyl-[acyl-carrier-protein]-UDP-N-acetylglucos	29,55446384	25	3	6	3	268	28,564	6,47	2,162	35,39402103	3
High	WP_017920006.1	A-type flagellin	23,46512354	24,48	3	4	3	384	38,41	4,97	1,512	24,24353743	3

High	WP_017921361.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	4,763929715	15,18	3	3	3	191	20,392	9,42	0,701	7,715981722	3
High	WP_165651430.1	putative bifunctional chitinase/lysozyme	22,38413403	16,09	3	6	3	373	38,719	5,55	1,61	30,44864392	3
High	WP_013696589.1	putative thiol peroxidase	9,12095239	27,54	3	3	3	167	17,329	5,31	0,995	9,895592928	3
High	WP_017920595.1	Peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 2	7,544641558	21,62	3	3	3	185	20,49	6,02	0,995	10,18371296	3
High	WP_013691373.1	FKBP-type 22 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isom	10,54152519	40,91	3	3	3	132	13,38	8,47	1,683	14,6338532	3
High	WP_013690956.1	hypothetical protein	7,873317888	19,69	3	3	3	127	14,258	6,96	1,683	8,957588911	3
High	WP_012734360.1	30S ribosomal protein S3	8,649117716	14,66	3	3	3	266	29,931	10,49	0,413	11,74305606	3
High	WP_017920413.1	Putative xanthine dehydrogenase YagS FAD-bin	9,947088809	16,56	3	3	3	326	34,731	8,88	0,369	11,31921458	3
High	WP_013698348.1	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	14,04056112	17,05	3	6	3	217	23,774	5,48	1,848	23,32584643	3
High	WP_165651592.1	Formyltetrahydrofolate deformylase	9,621347646	13,65	3	3	3	293	32,953	6,52	0,369	10,85152912	3
High	WP_017920770.1	putative D,D-dipeptide-binding periplasmic pro	7,243406871	8,598	3	3	3	535	58,507	8,37	0,259	9,54529047	3
High	WP_017919552.1	Bacterial leucyl aminopeptidase	23,34377831	14,15	3	5	3	417	44,243	6,89	0,688	24,17094398	3
High	WP_013689592.1	60 kDa chaperonin	11,42682515	12,59	5	6	3	540	56,964	5,36	0,484	18,08609104	5
High	WP_017918928.1	3-methylmercaptopyruvate-CoA dehydrogenase	10,53070049	7,718	3	3	3	596	63,369	5,71	0,212	10,94963956	3
High	WP_017921706.1	Limonene 1,2-monooxygenase	9,124545452	10,84	3	3	3	332	35,898	6,18	0,54	10,00043058	3
High	WP_017918976.1	hypothetical protein	10,9523184	13,58	3	3	3	383	42,274	6,73	0,369	11,48933768	3
High	WP_165651224.1	Glucokinase	6,814748696	8,791	3	3	3	637	68,25	7,06	0,205	11,96883702	3
High	WP_165650825.1	Glutamate--tRNA ligase	11,37251681	8,369	3	4	3	466	51,919	5,49	0,301	14,64240265	3
High	WP_013696508.1	8-demethylnovobiocic acid C(8)-methyltransferase	13,41622275	17,55	3	4	3	245	27,445	5,66	1,154	15,17962241	3
High	WP_013696309.1	hypothetical protein	9,288846395	14,23	3	3	3	267	27,212	6,05	0,701	9,787438154	3
High	WP_013696334.1	Orotate phosphoribosyltransferase	11,67142111	16,23	3	4	3	228	25,489	6,43	0,778	13,1879797	3
High	WP_165651019.1	Inositol 2-dehydrogenase	6,075027886	9,735	3	3	3	339	35,896	5,72	0,389	8,586406469	3
High	WP_165650981.1	hypothetical protein	10,15135599	13,93	3	3	3	402	42,502	5,1	0,389	13,17674327	3
High	WP_017920515.1	hypothetical protein	5,315878692	26,06	3	3	3	142	15,441	5,47	2,162	8,780397415	3
High	WP_020381247.1	Cysteine synthase B	10,78529177	15,67	3	3	3	300	32,755	6,18	0,468	11,65861464	3
High	WP_013698525.1	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N	14,59753487	16,36	3	4	3	275	29,518	5,94	0,719	17,11922908	3
High	WP_017920689.1	Putative prophage major tail sheath protein	11,29340967	8,974	3	4	3	390	41,85	5,16	0,501	15,45800781	3
High	WP_165652042.1	Carboxymethylenebutenolidase	15,94551475	15,46	3	5	3	291	31,712	6,6	0,624	23,24556494	3
High	WP_013697418.1	Gluconolactonase	12,9125202	17,04	3	3	3	311	35,049	5,35	0,468	13,52380562	3
High	WP_013698880.1	Acetolactate synthase isozyme 3 small subunit	10,23503477	26,38	3	3	3	163	17,959	5,96	0,778	11,95439982	3
High	WP_017920508.1	L-carnitine dehydrogenase	4,727064363	11,11	3	3	3	306	33,379	5,34	0,54	9,103569269	3
High	WP_013697766.1	Putative monooxygenase YcnE	10,0779383	32,29	3	4	3	96	10,731	5,83	3,642	14,55325615	3
High	WP_165651659.1	Glutathione amide reductase	8,936354244	11,7	3	3	3	453	48,742	6,34	0,292	12,16291296	3
High	WP_017921838.1	hypothetical protein	7,014772683	19,68	3	3	3	315	33,676	7,08	0,413	11,41529989	3
High	WP_165650536.1	putative 5-dehydro-4-deoxyglucarate dehydrat	13,33732569	10,82	3	4	3	305	32,97	6,25	0,585	18,31642723	3
High	WP_017919823.1	Pyrimidine-specific ribonucleoside hydrolase Ri	13,09718957	11,49	3	4	3	383	41,549	5,45	0,668	15,63556719	3
High	WP_043218604.1	hypothetical protein	3,42025412	19,42	2	2	2	139	15,931	6,19	0,585	5,68812108	2
High	WP_165650868.1	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	5,011218335	3,314	2	2	2	694	74,472	7,34	0,103	7,104290485	2
High	WP_013691574.1	hypothetical protein	9,180465356	9,704	2	3	2	371	40,693	6,02	0,389	13,93120563	2
High	WP_165651651.1	Non-heme chloroperoxidase	9,686622461	15,83	2	3	2	278	30,493	6,6	0,54	12,6538229	2
High	WP_013689417.1	General stress protein 69	4,25617952	9,195	2	2	2	348	38,199	5,78	0,233	6,336022735	2
High	WP_017919299.1	hypothetical protein	5,015202743	9,132	2	2	2	438	46,893	5,66	0,212	5,53326416	2
High	WP_013696464.1	hypothetical protein	6,387689676	6,452	2	2	2	496	54,692	5,43	0,16	7,668714046	2
High	WP_013697767.1	hypothetical protein	9,876041447	45,24	2	3	2	84	9,514	4,75	4,623	11,71595025	2

High	WP_165650792.1	Gamma-glutamylputrescine synthetase PuuA	4,07583923	5,631	2	2	2	444	49,952	5,3	0,274	6,091626167	2
High	WP_013697810.1	hypothetical protein	6,283466189	7,742	2	2	2	310	34,007	8,06	0,311	8,022089005	2
High	WP_165650567.1	Pseudomonalisin	5,415280459	8,939	2	2	2	537	54,987	5,58	0,233	7,227086782	2
High	WP_013697830.1	L-cystine-binding protein FliY	8,230402923	11,36	2	2	2	264	28,348	9,25	0,311	8,534261465	2
High	WP_017919082.1	Esterase TesA	4,775818503	13,25	2	2	2	234	24,609	9,17	0,52	6,414597511	2
High	WP_013699336.1	Lactoylglutathione lyase	12,00949073	16,92	2	3	2	130	14,733	5,53	1,683	12,8112061	2
High	WP_165650845.1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	4,533516151	4,684	2	2	2	491	55,633	5,88	0,15	6,477432489	2
High	WP_165652212.1	Transketolase 2	5,637678719	3,333	2	2	2	690	75,159	5,87	0,113	6,509512186	2
High	WP_013698253.1	hypothetical protein	4,623747462	10,85	2	2	2	258	29,216	5,29	0,311	5,704057217	2
High	WP_013691037.1	Quercetin 2,3-dioxygenase	21,00560669	19,92	2	4	2	241	26,34	5,94	1,031	23,76764679	2
High	WP_165650744.1	hypothetical protein	8,252489147	7,065	2	2	2	552	62,232	5,9	0,125	8,072347403	2
High	WP_013691464.1	L-methionine gamma-lyase	4,799919224	6,279	2	2	2	430	46,364	6,48	0,245	7,377401233	2
High	WP_017921329.1	hypothetical protein	5,702744527	19,53	2	2	2	128	14,127	8,43	0,668	6,361767054	2
High	WP_165652154.1	Formate dehydrogenase-O major subunit	4,80359625	15,82	2	2	2	196	21,415	8,46	0,468	7,215435982	2
High	WP_025096629.1	Uridylate kinase	4,057559357	8,861	2	2	2	237	25,355	8,12	0,292	4,872070432	2
High	WP_013689444.1	L-fuculose phosphate aldolase	7,085460688	13,68	2	2	2	212	22,676	6,89	0,468	9,076020479	2
High	WP_013696657.1	Iron-sulfur cluster insertion protein ErpA	5,417277737	18,55	2	2	2	124	13,402	4,18	1,154	6,744126558	2
High	WP_013696656.1	30S ribosomal protein S9	4,436561278	23,85	2	2	2	130	14,382	10,81	1,154	7,365316629	2
High	WP_165651650.1	hypothetical protein	3,959811505	10,38	2	2	2	212	22,961	6,2	0,425	6,646018028	2
High	WP_017919958.1	2-haloacrylate reductase	5,1385	6,825	2	2	2	337	34,826	6,13	0,292	6,879455328	2
High	WP_017919888.1	Manganese ABC transporter substrate-binding	15,05603215	16,45	2	3	2	310	32,918	9,13	0,638	19,00713348	2
High	WP_013698371.1	Acetylornithine deacetylase	4,532962756	5,911	2	2	2	406	43,612	5,81	0,202	6,55489254	2
High	WP_165650578.1	Glycine betaine-binding protein OpuAC	1,909063341	8,228	2	2	2	316	34,138	8,81	0,274	4,321176529	2
High	WP_013696200.1	Glycine cleavage system H protein	10,03739111	32,28	2	15	2	127	13,441	4,27	2,162	58,12782192	2
High	WP_017920805.1	putative hydrolase YxeP	7,658620879	10,08	2	2	2	397	43,081	5,99	0,259	9,33232832	2
High	WP_165651554.1	hypothetical protein	8,468036119	22,73	2	2	2	154	14,942	9,2	1,512	9,203874111	2
High	WP_017920760.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	3,39939298	4,822	2	2	2	394	41,944	6,13	0,778	5,141206503	2
High	WP_013690590.1	Citrate synthase	7,751247022	5,991	2	3	2	434	48,545	6,8	0,292	10,69362259	2
High	WP_013696828.1	Bis(5'-nucleosyl)-tetrphosphatase [symmetrica	5,801814736	10,28	2	2	2	282	30,625	6,16	0,311	7,300802469	2
High	WP_013696995.1	P-protein	8,270238061	10,83	2	2	2	360	39,335	6,25	0,202	8,928212166	2
High	WP_165651236.1	Aliphatic amidase expression-regulating protei	8,113203402	6,682	2	2	2	434	47,429	9,39	0,194	7,352720261	2
High	WP_165650643.1	Energy-dependent translational throttle protei	4,16056815	4,865	2	2	2	555	61,546	5,36	0,145	6,185078621	2
High	WP_017920013.1	hypothetical protein	3,860644788	8,602	2	3	2	279	31,763	6,92	0,413	9,00071764	2
High	WP_165651261.1	Outer membrane protein P6	12,62123818	18,13	2	5	2	171	18,799	7,5	3,217	19,29572964	2
High	WP_013699089.1	Cytosol aminopeptidase	6,739139748	4,97	2	2	2	503	52,909	7,33	0,141	6,971339941	2
High	WP_013698784.1	8-oxoguanine deaminase	5,628134803	5,459	2	2	2	458	50,453	6,16	0,172	6,709648609	2
High	WP_165651177.1	Thymidylate synthase	5,070152918	7,74	2	2	2	323	36,714	5,95	0,212	5,988756418	2
High	WP_017919904.1	hypothetical protein	3,648199482	9,783	2	2	2	276	30,272	6,07	0,274	5,38092804	2
High	WP_165651909.1	2-pyrone-4,6-dicarbaxylate hydrolase	6,267389268	10,65	2	2	2	310	33,892	7,59	0,389	7,334212542	2
High	WP_080630839.1	hypothetical protein	6,098497433	15,09	2	3	2	212	21,887	7,84	0,778	9,56350708	2
High	WP_165651689.1	DNA topoisomerase 3	8,177334938	4,535	2	2	2	882	97,626	8,85	0,081	9,78385663	2
High	WP_013689810.1	hypothetical protein	8,034828602	22,97	2	2	2	148	15,255	8,47	1,154	8,082791328	2
High	WP_013690556.1	N-alpha-acetyl-L-2,4-diaminobutyric acid deace	6,777010321	10,26	2	2	2	341	36,888	6,28	0,222	7,576893806	2
High	WP_017918953.1	Exo-beta-D-glucosaminidase	5,496319402	3,542	2	2	2	960	102,791	6,23	0,101	7,043287039	2

High	WP_013697008.1	Membrane-bound lytic murein transglycosylase	4,707359881	10,05	2	2	2	408	43,813	9,01	0,292	7,109088421	2
High	WP_013698507.1	Outer membrane protein assembly factor BamA	14,38537017	4,818	2	3	2	768	84,912	8,73	0,151	15,96844101	2
High	WP_165651751.1	NADP-dependent malic enzyme	8,477911695	4,749	2	2	2	758	80,721	5,91	0,129	8,340877533	2
High	WP_017918982.1	GDP-mannose 4,6-dehydratase	11,2812558	7,849	2	3	2	344	38,303	6,19	0,369	13,12305951	2
High	WP_013696368.1	50S ribosomal protein L3	4,323718992	9,259	2	2	2	216	22,597	10,07	0,389	5,908770084	2
High	WP_013697745.1	Chorismate synthase	12,09619087	9,563	2	3	2	366	39,277	6,25	0,413	11,78659773	2
High	WP_165651185.1	ADP-L-glycero-D-manno-heptose-6-epimerase	4,465149974	8,485	2	2	2	330	37,11	6,58	0,222	6,520118952	2
High	WP_165650648.1	Indole-3-glycerol phosphate synthase	7,825380154	11,11	2	3	2	261	28,572	5,21	0,585	9,859871387	2
High	WP_006401505.1	DNA-binding protein HU-beta	5,950022471	32,61	2	2	2	92	9,599	10,2	2,162	6,860821962	2
High	WP_165650799.1	hypothetical protein	7,476409595	16,4	2	2	2	189	19,949	6,58	0,359	8,301808357	2
High	WP_017919147.1	p-benzoquinone reductase	12,35014826	26,63	2	3	2	184	19,381	5,55	2,162	15,16673517	2
High	WP_013699410.1	HPr kinase/phosphorylase	3,43309304	5,59	2	2	2	322	35,157	5,9	0,233	4,424629569	2
High	WP_013696684.1	Paraquat-inducible protein B	15,67240013	8,824	2	3	2	544	59,119	6,48	0,233	15,78533268	2
High	WP_017919042.1	Carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylase	6,657775486	8,791	2	3	2	273	28,326	5,49	0,874	10,52622414	2
High	WP_165651074.1	Murein hydrolase activator NlpD	4,394442102	7,097	2	2	2	310	31,622	9,51	0,311	5,919047594	2
High	WP_017920191.1	hypothetical protein	21,54300222	17,84	2	6	2	213	23,089	5,4	1,424	29,66504812	2
High	WP_017921825.1	Imidazolonepropionase	4,389094019	4,423	2	2	2	407	43,37	5,97	0,212	5,033554554	2
High	WP_013689442.1	Putative hydroxypyruvate isomerase YgbM	4,258950878	15,12	2	2	2	258	28,743	5,52	0,311	6,78195405	2
High	WP_013689946.1	L-lactate dehydrogenase	6,677667762	8,146	2	2	2	356	37,182	6,6	0,292	7,849858522	2
High	WP_165650614.1	Elongation factor G	6,24675915	4,857	2	2	2	700	77,451	5,53	0,103	8,309258938	2
High	WP_043217571.1	hypothetical protein	10,84290012	8,068	2	4	2	409	46,454	7,25	0,292	17,32109499	2
High	WP_017921640.1	hypothetical protein	3,760895309	10,37	2	2	2	241	27,42	6,76	0,359	7,033931017	2
High	WP_013698710.1	3',5'-nucleoside bisphosphate phosphatase	7,093662156	18,84	2	2	2	276	29,718	5,87	0,334	11,20505953	2
High	WP_165650834.1	Chromosome partition protein Smc	5,975495902	3,157	2	2	2	1172	129,284	5,16	0,059	6,819922686	2
High	WP_013690098.1	Putative cysteine protease YraA	9,509621673	15,63	2	3	2	192	20,706	6,23	0,778	13,85194445	2
High	WP_013696950.1	Ribonuclease PH	5,299802505	9,465	2	2	2	243	25,96	5,95	0,359	6,170056343	2
High	WP_017921496.1	hypothetical protein	6,625359911	40,48	2	2	2	84	9,412	6,14	1,512	7,278645277	2
High	WP_013699439.1	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	6,006313406	7,629	2	2	2	367	39,033	6,43	0,233	7,704141855	2
High	WP_165651594.1	Beta-barrel assembly-enhancing protease	5,68705125	4,032	2	2	2	620	67,645	6,07	0,122	7,534430981	2
High	WP_013697746.1	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	6,622784498	4,668	2	2	2	557	60,544	6,33	0,15	7,551566362	2
High	WP_017921099.1	Deoxyguanosinetriphosphate triphosphohydrolyase	6,487860044	7,353	2	3	2	408	45,862	6,73	0,389	10,26866794	2
High	WP_017920196.1	hypothetical protein	3,946183883	8,23	2	2	2	243	25,278	6,7	0,389	6,278711319	2
High	WP_013697093.1	Elongation factor P	9,324854998	13,51	2	3	2	185	20,739	4,91	0,995	11,27432251	2
High	WP_013697348.1	putative GST-like protein YibF	12,69425897	13,88	2	4	2	209	22,967	5,6	0,778	15,80998898	2
High	WP_036034115.1	Acetyl-S-ACP:malonate ACP transferase	4,876523843	5,292	2	2	2	548	60,075	6,4	0,179	7,28101182	2
High	WP_165652300.1	putative oxidoreductase	9,809792051	6,314	2	2	2	776	85,869	6,51	0,099	9,869768143	2
High	WP_017918288.1	Bifunctional aspartate aminotransferase and L-alanine aminotransferase	3,998269834	3,636	2	2	2	550	62,144	6,02	0,145	5,644395113	2
High	WP_165650880.1	Chaperone protein ClpB	11,97853781	3,815	2	3	2	865	95,92	5,92	0,134	16,12816381	2
High	WP_017920086.1	Non-hemolytic phospholipase C	6,985028349	4,327	2	2	2	624	67,609	6,84	0,179	7,888525248	2
High	WP_036050055.1	2-(acetamidomethylene)succinate hydrolase	5,810780173	11,07	2	2	2	298	33,455	6,47	0,425	8,441723347	2
High	WP_017919251.1	hypothetical protein	5,723654851	5,224	2	2	2	536	54,456	4,86	0,778	7,744603872	2
High	WP_165651232.1	hypothetical protein	3,832610289	3,46	2	2	2	289	31,692	5,35	0,259	5,26422298	2
High	WP_013696374.1	50S ribosomal protein L5	4,577940796	11,73	2	2	2	179	19,988	9,83	0,359	5,164593458	2
High	WP_165651268.1	N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl L-malate synthase	5,013252085	1,973	2	2	2	1115	124,229	6,71	0,07	5,813228607	2

High	WP_017920949.1	putative D,D-dipeptide-binding periplasmic pro	5,840504032	5,094	2	2	2	530	57,569	9,2	0,172	8,692476273	2
High	WP_013696350.1	Transcription termination/antitermination prot	5,92089878	14,05	2	2	2	185	20,962	7,5	0,468	7,074946404	2
High	WP_017921762.1	hypothetical protein	16,40699533	33,81	2	3	2	139	14,648	8,4	0,995	17,86152935	2
High	WP_013689294.1	Beta-ketoadipyl-CoA thiolase	7,795191447	10,75	2	2	2	400	41,767	6,92	0,202	9,721462965	2
High	WP_017918590.1	Murein tetrapeptide carboxypeptidase	8,423295584	10,58	2	2	2	312	33,731	6,54	0,334	10,70859528	2
High	WP_013690093.1	hypothetical protein	8,224066851	21,15	2	3	2	104	11,792	4,7	2,981	10,56725574	2
High	WP_165652068.1	Manganese catalase	9,295104727	6,102	2	3	2	295	31,58	4,64	0,501	13,21965909	2
High	WP_013690030.1	hypothetical protein	7,148232296	17,56	2	2	2	131	13,764	4,83	1,512	8,574152231	2
High	WP_017919246.1	Phenylacetaldehyde dehydrogenase	6,519483707	6,721	2	2	2	491	51,97	5,49	0,179	7,48381114	2
High	WP_013697826.1	Ribose-5-phosphate isomerase A	10,52988365	19,48	2	2	2	231	24,017	5,06	0,425	10,36410999	2
High	WP_013698515.1	30S ribosomal protein S2	4,480027178	8,943	2	2	2	246	27,126	7,65	0,274	6,465641737	2
High	WP_017919369.1	Pseudomonalisin	26,30969209	8,202	2	4	2	634	65,307	6,24	0,445	26,9557972	2
High	WP_013689606.1	Glutathione-binding protein GsiB	7,026796937	5,882	2	2	2	527	56,891	8,59	0,172	5,38518858	2
High	WP_165651046.1	Argininosuccinate lyase	5,126987525	2,685	2	2	2	894	94,728	6,58	0,093	6,138051271	2
High	WP_013696906.1	Riboflavin synthase	12,83912303	20,38	2	3	2	211	21,935	6,2	1,154	19,53316021	2
High	WP_013698768.1	hypothetical protein	3,022735618	24,68	2	2	2	154	16,806	6,54	0,585	6,029182673	2
High	WP_165651045.1	Tyrocidine synthase 3	7,338067924	0,633	2	2	2	6323	675,823	5,86	0,012	7,732034445	2
High	WP_165651494.1	hypothetical protein	5,656390161	8,721	2	2	2	344	36,855	6,64	0,274	7,913882732	2
High	WP_017921902.1	hypothetical protein	9,360888202	21,35	2	2	2	192	20,091	6,92	0,585	10,8000617	2
High	WP_013698249.1	Nucleoside diphosphate kinase	3,178089801	14,89	2	2	2	141	15,222	5,87	0,668	4,494158745	2
High	WP_013696809.1	hypothetical protein	6,925749937	24,58	2	2	2	118	11,774	10,05	0,931	7,087141037	2
High	WP_165651044.1	Decarbamoylnovobiocin carbamoyltransferase	5,092721743	4,538	2	2	2	573	63,528	5,71	0,172	5,974972725	2
High	WP_017921553.1	hypothetical protein	9,445190198	20,93	2	2	2	129	14,057	8,21	1,154	8,340456724	2
High	WP_017918705.1	hypothetical protein	5,164410782	19,5	2	3	2	159	18,902	7,05	0,778	11,97575021	2
High	WP_013699198.1	Thioredoxin 1	4,990330907	13,83	2	2	2	282	31,557	4,92	0,274	5,728961229	2
High	WP_017919182.1	hypothetical protein	10,94528434	7,592	2	4	2	461	48,435	5,72	1,512	17,83435249	2
High	WP_165650618.1	30S ribosomal protein S11	6,226769208	23,31	2	2	2	133	14,181	11,21	0,778	6,905037642	2
High	WP_013696928.1	Septum site-determining protein MinD	17,08533529	14,02	2	4	2	271	29,367	5,94	0,931	17,23207545	2
High	WP_017918344.1	putative phospholipid-binding lipoprotein MlaA	3,745751586	6,23	2	2	2	305	31,899	7,05	0,425	5,113950968	2
High	WP_165652020.1	Muconate cycloisomerase 1	5,285646766	5,867	2	2	2	375	39,954	5,6	0,311	6,612312555	2
High	WP_165651258.1	HTH-type transcriptional regulator PgrR	15,52312972	16,72	2	3	2	323	35,535	7,15	0,35	16,48317528	2
High	WP_165651363.1	hypothetical protein	17,12909178	27,54	2	3	2	138	14,527	6,77	1,371	13,67257357	2
High	WP_017920318.1	hypothetical protein	4,175095154	23,13	2	2	2	134	14,197	10,54	0,931	7,841707468	2
High	WP_165651589.1	Multidrug export protein EmrA	2,394264106	2,723	1	1	1	404	43,111	7,15	0,096	2,649887323	1
High	WP_165651005.1	Translation initiation factor IF-2	11,39408866	2,53	1	2	1	988	105,973	6,35	0,081	9,927908421	1
High	WP_017920186.1	hypothetical protein	1,877784122	3,642	1	1	1	302	31,814	6,23	0,145	2,575084448	1
High	WP_017920360.1	3-keto-5-aminohexanoate cleavage enzyme	2,98254927	4,194	1	1	1	310	33,622	6,8	0,155	3,14398694	1
High	WP_017920513.1	NADPH-dependent curcumin reductase	2,825358807	3,254	1	1	1	338	36,082	6,27	0,145	2,778431892	1
High	WP_013698375.1	Phage shock protein A	3,170053304	7,08	1	1	1	226	24,502	5,35	0,122	4,292966843	1
High	WP_165651355.1	Gluconate 2-dehydrogenase flavoprotein	1,938170693	2,03	1	1	1	591	65,242	7,3	0,068	2,736108541	1
High	WP_013697258.1	hypothetical protein	3,109132061	11,41	1	1	1	149	15,411	6,8	0,468	3,839098692	1
High	WP_013691065.1	hypothetical protein	7,878440156	21,88	1	1	1	128	13,772	6,25	0,292	8,545472145	1
High	WP_013698954.1	Cytochrome c-554(548)	9,062034354	14,17	1	2	1	120	12,821	8,75	1,154	9,056250572	1
High	WP_013697791.1	hypothetical protein	6,193333753	11,11	1	2	1	153	16,534	8,18	0,585	11,15672159	1

High	WP_013698266.1	50S ribosomal protein L31 type B	7,864743282	18,39	1	2	1	87	9,831	9,52	0,931	10,38735628	1
High	WP_013696877.1	Undecaprenyl-diphosphatase	0,810229044	5,435	1	1	1	276	30,218	8,09	0,194	2,325568914	1
High	WP_043217958.1	hypothetical protein	1,804377056	10,37	1	1	1	135	14,843	5,86	0,233	2,780267	1
High	WP_013690173.1	Aromatic-amino-acid aminotransferase	1,630969778	3,75	1	1	1	400	43,527	6,14	0,096	2,9323771	1
High	WP_013698213.1	hypothetical protein	2,497299825	5,495	1	1	1	182	18,6	8,75	0,212	3,395194292	1
High	WP_013698600.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyp18	2,827981191	7,362	1	1	1	163	17,798	6,19	0,259	3,184855223	1
High	WP_013698901.1	Potassium-transporting ATPase ATP-binding sul	0,816730156	2,882	1	2	1	694	73,341	7,53	0,064	2,474840879	1
High	WP_013690891.1	Farnesyl diphosphate synthase	3,358922687	6,122	1	1	1	294	30,975	5,64	0,155	3,661696434	1
High	WP_017920323.1	Phosphoribosylamine--glycine ligase	2,791021483	4,471	1	1	1	425	45,609	6,06	0,089	3,713828325	1
High	WP_013699636.1	Bleomycin resistance protein	1,599462011	9,091	1	1	1	121	13,798	5,77	0,389	3,057328463	1
High	WP_013696593.1	Biotin carboxyl carrier protein of acetyl-CoA car	3,757210191	14,1	1	1	1	156	16,005	4,7	0,585	3,316646338	1
Medium	WP_013697163.1	Uronate dehydrogenase	0,649751982	5,714	1	1	1	280	30,538	6,43	0,136	2,116141558	1
Medium	WP_017921441.1	hypothetical protein	0,66174277	8,397	1	1	1	131	14,711	5,19	0,292	1,852458477	1
High	WP_165651040.1	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	3,580539927	3,746	1	1	1	347	38,267	6,65	0,11	3,616854191	1
High	WP_017918381.1	hypothetical protein	1,661942125	9,783	1	1	1	184	20,67	5,63	0,259	2,385257959	1
High	WP_012735022.1	Acyl carrier protein	6,294596901	17,72	1	13	1	79	8,692	4,18	2,162	43,59624743	1
High	WP_013699403.1	3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate p	3,103143227	6,704	1	1	1	179	18,97	6,64	0,194	3,457900047	1
High	WP_165651622.1	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacC	11,96650676	4,839	1	2	1	434	45,983	9,31	0,212	12,03495026	1
High	WP_013696223.1	hypothetical protein	3,191181575	10,56	1	1	1	180	19,824	8,73	0,233	3,569235563	1
High	WP_013696588.1	Adenosine kinase	1,624153564	2,885	1	1	1	312	33,865	6,04	0,122	2,305492163	1
High	WP_165652163.1	D-hydantoinase/dihydropyrimidinase	2,268089058	4,742	1	1	1	485	53,014	6,42	0,093	5,299469948	1
High	WP_013696377.1	50S ribosomal protein L6	1,854803594	6,818	1	1	1	176	18,768	9,7	0,233	2,803681135	1
High	WP_013696921.1	Outer-membrane lipoprotein carrier protein	1,885055584	3,524	1	1	1	227	24,331	9,25	0,194	2,320290565	1
High	WP_165651035.1	Putative deoxyribonuclease Rhsc	3,371304617	0,906	1	1	1	1545	172,365	6,37	0,022	4,037053585	1
High	WP_013690633.1	hypothetical protein	4,583525921	13,77	1	1	1	167	16,594	7,78	2,162	3,961422682	1
High	WP_165651379.1	Glycogen operon protein GlgX	1,934793872	0,984	1	1	1	813	89,781	6,44	0,05	2,295525789	1
High	WP_013699393.1	Single-stranded DNA-binding protein	4,891773344	18,69	1	1	1	198	19,738	5,71	0,155	4,599572659	1
High	WP_013699416.1	Outer-membrane lipoprotein LolB	5,157890237	9,174	1	1	1	218	23,118	9,42	0,194	4,95406723	1
High	WP_165652252.1	Esterase EstB	1,401318901	2,296	1	1	1	392	41,802	5,47	0,096	2,537448168	1
High	WP_013689279.1	Isoquinoline 1-oxidoreductase subunit alpha	1,768020973	7,947	1	1	1	151	15,599	6,73	0,292	2,501657486	1
High	WP_165650839.1	Phosphoenolpyruvate synthase	4,148252581	2	1	1	1	800	87,914	5,3	0,046	3,936294079	1
High	WP_017919718.1	Alcohol dehydrogenase cytochrome c subunit	2,542269452	2,283	1	1	1	438	47,21	8,38	0,101	3,10086298	1
High	WP_165652046.1	hypothetical protein	3,694863681	9,459	1	1	1	148	15,674	6,84	0,334	4,757969856	1
High	WP_013699700.1	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	5,198750482	5,476	1	2	1	347	38,269	6,46	0,222	7,939096451	1
Medium	WP_165652096.1	Tyrosidine synthase 3	0,533280628	0,513	1	1	1	3702	398,109	6,15	0,011	0	1
High	WP_165652141.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	1,895171596	1,919	1	1	1	469	50,827	6,37	0,086	2,115644932	1
High	WP_165650930.1	Polyketide synthase PksL	1,00590291	0,467	1	1	1	4069	430,81	5,86	0,011	3,140346527	1
High	WP_013689142.1	hypothetical protein	3,526659036	3,725	1	1	1	349	38,082	8,51	0,116	3,268270493	1
High	WP_017919309.1	Chloramphenicol acetyltransferase	5,120961495	6,751	1	1	1	237	26,023	6,4	0,155	4,418561459	1
High	WP_013698136.1	2-ketogluconate reductase	1,781727146	2,5	1	1	1	320	34,695	6,06	0,122	2,090377092	1
High	WP_013689473.1	Sarcosine oxidase subunit alpha	3,073451775	1,296	1	1	1	1003	108,09	8,53	0,041	4,204249859	1
High	WP_013698859.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit H	2,505149978	4,237	1	1	1	354	39,285	8,03	0,292	3,351831436	1
High	WP_013696616.1	Guanyl-specific ribonuclease Sa	1,549596914	7,143	1	1	1	140	15,086	9,99	0,389	2,952949524	1
High	WP_013696640.1	KHG/KDPG aldolase	6,884389488	10,1	1	1	1	208	21,827	7,5	0,179	5,600680828	1

High	WP_165650795.1	Exodeoxyribonuclease III	1,339513984	4,264	1	1	1	258	29,455	5,67	0,136	3,416906357	1
High	WP_043217047.1	hypothetical protein	3,518270803	7,527	1	1	1	186	19,39	8,7	0,292	3,397204161	1
High	WP_013697195.1	Multidrug resistance protein MdtA	4,385946894	5,83	1	1	1	446	47,089	9,38	0,093	3,95518589	1
High	WP_165651306.1	Biotin carboxylase	5,652084813	4,835	1	1	1	455	50,323	6,61	0,083	5,22715807	1
High	WP_013697430.1	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase	3,711080394	4,305	1	1	1	302	33,918	6,28	0,155	3,906761408	1
High	WP_013699059.1	Methionine--tRNA ligase	3,189834715	2,089	1	1	1	718	79,134	6,2	0,054	3,108302593	1
High	WP_017920121.1	Copper homeostasis protein CutC	7,546528766	8,403	1	1	1	238	24,189	6,7	0,194	6,440880775	1
High	WP_165650549.1	hypothetical protein	5,689094371	4,749	1	1	1	358	38,705	6,38	0,136	5,091334343	1
High	WP_017918329.1	hypothetical protein	0,909389292	11,05	1	1	1	172	19,427	5,26	0,212	2,71289587	1
High	WP_165650615.1	50S ribosomal protein L2	2,894149326	5,091	1	1	1	275	30,089	11,4	0,136	3,874661684	1
High	WP_013689131.1	2-hydroxy-3-oxopropionate reductase	3,829738285	5,119	1	1	1	293	31,364	6,16	0,155	5,062111378	1
High	WP_165650991.1	Ribonuclease R	4,086292086	2,184	1	1	1	824	91,549	9,09	0,047	4,61584568	1
High	WP_013696465.1	hypothetical protein	6,404977484	8,982	1	3	1	167	18,573	6,19	0,874	11,80166578	1
High	WP_165650919.1	Phthiocerol/phenolphthiocerol synthesis polyke	1,380906669	9,346	1	1	1	321	32,926	7,05	0,136	2,138169765	1
High	WP_013697690.1	Succinyl-CoA--L-malate CoA-transferase beta su	3,126214539	3,202	1	1	1	406	43,727	6,11	0,096	3,431800604	1
High	WP_013699372.1	Putative cysteine protease YraA	2,591081979	5,181	1	1	1	193	20,552	5,77	0,334	3,079495668	1
High	WP_013698137.1	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG	2,442011852	6,426	1	1	1	249	26,263	7,31	0,166	3,793530941	1
High	WP_013689230.1	Proton/glutamate-aspartate symporter	0,915781313	9,382	1	1	1	437	45,805	9,23	0,129	0	1
High	WP_013696295.1	Carboxymethylenebutenolidase	3,920095532	7,826	1	1	1	230	24,404	6,2	0,212	4,959214687	1
High	WP_043217341.1	Cell division protein FtsN	3,61672335	4,412	1	1	1	272	27,937	9,91	0,259	4,689259529	1
High	WP_017920954.1	2-haloalkanoic acid dehalogenase	2,37161107	5,263	1	1	1	247	26,442	8,13	0,136	3,544563293	1
High	WP_165651373.1	L-arabinolactonase	2,413075292	4,732	1	1	1	317	33,99	5,05	0,136	3,747587919	1
High	WP_012734653.1	50S ribosomal protein L13	1,907279355	7,042	1	1	1	142	15,959	9,89	0,389	2,648547411	1
High	WP_013697777.1	Transcription termination/antitermination prot	4,650528201	4,073	1	1	1	491	54,825	4,72	0,083	5,092253685	1
High	WP_013699143.1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subu	1,63921731	1,961	1	1	1	765	84,101	6,28	0,049	3,390339375	1
High	WP_017920955.1	Dihydroorotase	1,432033093	2,514	1	1	1	358	38,726	6,95	0,116	2,358064651	1
High	WP_013697724.1	hypothetical protein	1,343805938	1,911	1	1	1	471	50,344	9,29	0,086	2,322157621	1
High	WP_165651950.1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	4,023604163	3,542	1	1	1	367	41,775	6,06	0,086	4,229039192	1
High	WP_165651315.1	Cell division protein FtsZ	0,897909474	2,519	1	1	1	397	41,454	4,96	0,116	2,674257278	1
High	WP_013689933.1	hypothetical protein	1,116906641	7,692	1	3	1	299	34,908	9,06	0,11	0	1
High	WP_013696620.1	hypothetical protein	5,240634378	16,67	1	1	1	138	15,386	4,97	0,334	5,605859756	1
High	WP_017919872.1	Histidine--tRNA ligase	1,800244823	2,477	1	1	1	444	49,286	5,19	0,089	2,156194687	1
Medium	WP_165651584.1	putative protein kinase UbiB	0,608888386	1,714	1	1	1	525	59,783	8,73	0,061	2,019409418	1
High	WP_017917949.1	Sarcosine oxidase subunit gamma	2,743763467	6,161	1	1	1	211	22,96	6,33	0,179	3,384966373	1
Medium	WP_043216691.1	putative chromosome-partitioning protein ParE	0,532391894	2,768	1	1	1	289	31,884	9,64	0,129	1,916718006	1
High	WP_017920887.1	UDP-4-amino-4-deoxy-L-arabinose--oxoglutarat	2,92190585	2,872	1	1	1	383	41,802	6,02	0,116	3,566819191	1
High	WP_013696372.1	50S ribosomal protein L14	1,755228239	8,197	1	1	1	122	13,459	10,27	0,233	2,851648331	1
High	WP_165651098.1	Putative deoxyribonuclease RhsC	3,819587367	1,827	1	1	1	985	111,073	6,15	0,034	6,378957748	1
High	WP_165650529.1	hypothetical protein	3,457299031	9,028	1	1	1	144	16,397	7,01	0,259	3,86603713	1
High	WP_013699784.1	Outer membrane lipoprotein Blc	1,281000362	3,902	1	1	1	205	22,959	9,79	0,179	2,379481077	1
High	WP_165651112.1	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	4,284748971	2,385	1	1	1	629	68,537	6,34	0,056	3,947233677	1
High	WP_165651291.1	Glutamate dehydrogenase	6,017496482	3,226	1	2	1	434	46,815	6,81	0,359	7,677030802	1
High	WP_165650912.1	Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase B	1,773657913	4,375	1	1	1	320	34,094	6,11	0,129	2,121166945	1
High	WP_013688939.1	hypothetical protein	3,63339029	10	1	1	1	130	14,587	6,19	0,292	3,874530792	1

High	WP_165651259.1	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	0,924818145	3,302	1	1	1	212	23,954	6,42	0,179	2,050295353	1
High	WP_165651184.1	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	4,098923284	5,788	1	1	1	311	31,664	5	0,136	3,895494223	1
High	WP_013691720.1	putative phospholipid-binding protein MlaC	14,44608907	13,64	1	2	1	198	21,219	9,55	0,468	12,3248539	1
High	WP_017918968.1	NAD kinase	9,758091592	6,667	1	2	1	300	32,343	6,21	0,334	9,721478462	1
High	WP_013688840.1	hypothetical protein	1,655411257	3,226	1	1	1	403	44,876	6,62	0,105	3,093006849	1
High	WP_017919903.1	hypothetical protein	3,833569886	12,6	1	1	1	127	13,806	5,22	0,389	4,038215637	1
High	WP_013690313.1	Enoyl-CoA-hydratase	2,114469167	3,448	1	1	1	261	28,041	5,78	0,145	2,665476799	1
High	WP_017921169.1	hypothetical protein	5,606951534	8,571	1	1	1	210	22,153	9,98	0,194	5,658799171	1
High	WP_013696631.1	Biopolymer transport protein ExbB	1,612432221	4,741	1	1	1	232	23,977	7,52	0,334	2,618271112	1
High	WP_013698855.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit L	1,263683192	1,173	1	1	1	682	74,331	7,06	0,101	2,123696327	1
High	WP_013689326.1	D-xylose-binding periplasmic protein	3,735182177	5,398	1	1	1	352	36,209	7,36	0,116	4,900127888	1
High	WP_013699032.1	Lysine/arginine/ornithine-binding periplasmic p	3,093180285	5,814	1	1	1	258	28,134	7,81	0,155	3,257570028	1
High	WP_165651010.1	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A tr	1,300509155	5,634	1	1	1	213	22,35	4,83	0,292	3,31923151	1
High	WP_013697945.1	Ureidoglycolate lyase	2,851705903	4,221	1	1	1	308	33,194	5,57	0,136	3,572351694	1
High	WP_013698911.1	Oxygen-dependent coproporphyrinogen-III oxid	2,628378073	5,195	1	1	1	308	34,724	6,11	0,105	4,419933319	1
High	WP_165651608.1	PTS system N-acetylglucosamine-specific EIICB/A	3,434152181	1,868	1	1	1	589	60,761	8,29	0,101	3,091043711	1
Medium	WP_165652140.1	Aconitate hydratase A	0,465593101	0,994	1	1	1	905	98,459	6,76	0,043	1,775809407	1
High	WP_165650926.1	Polyketide biosynthesis 3-hydroxy-3-methylglut	2,757955761	2,625	1	1	1	419	46,001	5,52	0,122	2,964574814	1
High	WP_165650850.1	allantoicase	1,517555208	2,374	1	1	1	337	37,338	6,67	0,129	2,206505775	1
High	WP_013699162.1	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase B	1,442853858	2,857	1	1	1	280	30,653	5,34	0,136	2,397681475	1
High	WP_165650779.1	hypothetical protein	6,648010545	3,158	1	1	1	570	61,58	6,2	0,089	5,258261204	1
High	WP_013696793.1	hypothetical protein	3,961379838	8,582	1	1	1	268	29,639	6,67	0,136	4,685324669	1
High	WP_013698243.1	Outer membrane protein assembly factor Bamf	6,700454351	4,462	1	2	1	381	40,034	8,62	0,311	8,810630322	1
High	WP_013698732.1	Chaperone protein HscA	2,341797747	4,019	1	1	1	622	65,71	5,01	0,068	4,168436527	1
High	WP_013698209.1	putative ABC transporter ATP-binding protein Y	5,08650404	4,023	1	1	1	522	58,664	5,22	0,083	4,427752018	1
High	WP_165651156.1	N-succinylarginine dihydrolase	2,471854922	2,444	1	1	1	450	48,441	5,85	0,101	3,170633554	1
High	WP_013699356.1	Aspartate--tRNA(Asp/Asn) ligase	1,501413791	2,167	1	1	1	600	67,621	6,07	0,059	3,240764141	1
High	WP_013690593.1	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	5,398290626	4,23	1	2	1	591	64,413	6,74	0,125	6,571068287	1
High	WP_013689767.1	hypothetical protein	6,943095149	17,07	1	1	1	164	18,476	5,87	0,292	6,069742203	1
High	WP_165651341.1	Outer membrane porin protein	6,070785496	8,31	1	1	1	361	37,742	9,31	0,145	4,399916172	1
High	WP_017921988.1	Ecotin	3,501138311	6,742	1	1	1	178	18,94	8,63	0,212	3,486761093	1
High	WP_013697325.1	hypothetical protein	1,998699067	18,18	1	1	1	110	11,649	5,74	0,334	3,262046814	1
High	WP_013696488.1	Aspartate-proton symporter	2,26066504	2,068	1	1	1	532	57,796	8,56	0,129	2,485566854	1
High	WP_017919723.1	30S ribosomal protein S4	1,178159073	3,865	1	1	1	207	23,139	10,13	0,179	2,549288988	1
High	WP_013698826.1	Aromatic-amino-acid aminotransferase	2,619246229	2,757	1	1	1	399	42,56	6,44	0,096	3,059146404	1
Medium	WP_043216323.1	hypothetical protein	0,779107751	17,48	1	1	1	246	28,003	9,35	0,166	0	1
High	WP_165651946.1	hypothetical protein	4,972983275	1,429	1	2	1	910	95,569	5,81	0,155	5,537059546	1
High	WP_017921191.1	Thermolabile glutaminase	4,956244873	5,592	1	1	1	304	32,762	5,49	0,155	4,436260223	1
High	WP_017920722.1	hypothetical protein	3,532836034	1,923	1	1	1	624	66,941	6,16	0,062	3,652267933	1
Medium	WP_165651653.1	Fructose dehydrogenase large subunit	0,591420875	4,356	1	1	1	528	57,856	7,84	0,083	0	1
High	WP_165650835.1	DNA ligase	3,193277497	1,881	1	1	1	691	75,568	5,74	0,053	3,392326355	1
Medium	WP_080562287.1	hypothetical protein	0,482144581	17,67	1	1	1	249	28,101	8,92	0,179	0	1
High	WP_165652152.1	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,805208242	2,712	1	1	1	295	32,79	5,97	0,122	2,062666416	1
High	WP_165651964.1	putative inactive lipase	5,531209738	3,881	1	1	1	438	45,771	6	0,179	5,288394451	1

High	WP_017920978.1	putative oxidoreductase YghA	2,664943481	6	1	1	1	300	32,008	5,67	0,122	4,357256889	1
High	WP_165650747.1	Polyketide biosynthesis 3-hydroxy-3-methylglut	3,794524963	3,819	1	1	1	419	46,368	5,6	0,122	4,108847618	1
Medium	WP_013696733.1	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	0,494036482	3,134	1	1	1	351	36,734	5,11	0,145	2,438513517	1
High	WP_013697752.1	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carb	4,27205229	10,03	1	1	1	299	32,47	5,41	0,116	5,761345863	1
High	WP_013690120.1	L-2-keto-3-deoxyarabonate dehydratase	2,790216985	7,12	1	1	1	309	33,861	6,13	0,129	3,250032425	1
High	WP_165651309.1	Ribonucleoside-diphosphate reductase 1 subun	3,169154808	1,208	1	1	1	993	108,868	6,25	0,038	3,806719542	1
High	WP_017918412.1	Pyridoxine 5'-phosphate synthase	3,793713956	5,058	1	1	1	257	27,604	5,85	0,212	3,520397902	1
High	WP_017921782.1	Methyl-accepting chemotaxis protein PctC	2,392759496	1,971	1	1	1	558	60,316	5,24	0,066	2,723971844	1
High	WP_165651219.1	Serine--tRNA ligase	1,33866066	1,617	1	1	1	433	47,567	6,04	0,089	1,660183311	1
High	WP_013699469.1	putative CtpA-like serine protease	2,516270101	2,124	1	1	1	518	56,327	8,82	0,066	2,823043346	1
High	WP_017918699.1	Arsenate reductase	2,634512015	9,322	1	1	1	118	13,22	6,79	0,334	3,196079969	1
High	WP_165651792.1	Luminescence regulatory protein LuxO	1,575445023	4,965	1	1	1	423	46,425	5,34	0,086	2,555153847	1
High	WP_017921564.1	hypothetical protein	1,67223251	4,624	1	1	1	173	18,574	5,14	0,292	2,889402151	1
High	WP_165650587.1	Gamma-glutamyltranspeptidase	2,176786687	1,88	1	1	1	585	62,325	6,19	0,077	3,226066351	1
High	WP_165651555.1	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit be	3,760450279	3,608	1	1	1	388	41,187	5,15	0,089	3,55234766	1
High	WP_013699037.1	Nitrogen regulatory protein P-II	1,257510535	7,143	1	1	1	112	12,248	6,15	0,389	2,373661995	1
Medium	WP_165652189.1	Tyrosidine synthase 3	0,449771647	0,352	1	1	1	2843	303,055	5,57	0,013	1,855704546	1
High	WP_017920632.1	Cytochrome c4	5,527243551	8,295	1	1	1	217	22,331	8,94	0,179	5,462983608	1
High	WP_013689875.1	Arabinose 5-phosphate isomerase KdsD	3,272133551	7,843	1	1	1	153	17,045	6,7	0,212	3,774048805	1
High	WP_013699328.1	Magnesium and cobalt efflux protein CorC	3,620150821	4,407	1	1	1	295	33,533	4,87	0,145	4,275463104	1
High	WP_043218451.1	putative deferrochelataase/peroxidase YfeX	6,237344839	6,034	1	2	1	348	37,269	5,11	0,292	7,726162195	1
High	WP_165651107.1	hypothetical protein	7,004815126	6,333	1	2	1	300	33,034	9,95	0,259	10,78764105	1
High	WP_013696839.1	N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl L-malate syntha	1,485850866	2,427	1	1	1	412	46,098	6,49	0,105	2,822376966	1
High	WP_165651252.1	10 kDa chaperonin 3	1,210842508	9,278	1	1	1	97	10,443	5,54	0,389	2,346186876	1
High	WP_017920622.1	Aldehyde dehydrogenase PucC	7,093072653	5,253	1	1	1	495	52,931	5,68	0,075	7,91084528	1
High	WP_013696373.1	50S ribosomal protein L24	1,77702355	9,901	1	1	1	101	10,615	10,17	0,468	3,088718176	1
High	WP_017921362.1	hypothetical protein	3,748118545	7,347	1	1	1	245	25,633	8,88	0,179	4,422185421	1
High	WP_013691716.1	Sensory transduction protein regX3	4,345053773	6,114	1	1	1	229	25,612	6,07	0,136	4,351302147	1
High	WP_165650798.1	Dihydropolyllysine-residue acetyltransferase co	9,997210298	4,753	2	3	1	547	56,504	5,88	0,233	12,75673532	2
High	WP_013696445.1	Periplasmic pH-dependent serine endoprotease	2,039576793	3,98	1	1	1	402	42,294	6,15	0,116	3,388909101	1
High	WP_165651011.1	putative succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A tr	4,118045029	9,829	1	1	1	234	25,123	5,99	0,259	4,353410244	1
High	WP_043218641.1	Endoglucanase E1	3,535808629	2,892	1	1	1	415	46,204	5,38	0,166	3,71126318	1
High	WP_013688928.1	Putative universal stress protein	7,478682088	8,589	1	2	1	163	17,54	5,31	0,668	7,800852537	1
High	WP_017918889.1	putative bifunctional chitinase/lysozyme	3,286509457	2,995	1	1	1	434	44,217	5,1	0,585	4,521272182	1
High	WP_126241236.1	Sulfoxide reductase catalytic subunit YedY	5,150703459	3,908	1	1	1	435	47,391	7,39	0,093	5,171256542	1
High	WP_013696736.1	putative membrane protein	1,825358807	4,846	1	1	1	227	24,755	10,14	0,334	2,389509201	1
High	WP_017921220.1	RutC family protein YjgH	3,059383918	11,19	1	1	1	134	14,962	5,07	0,292	3,342515469	1
High	WP_165651270.1	hypothetical protein	3,881735274	4,885	1	1	1	348	37,468	5,97	0,116	5,540719032	1
High	WP_013698326.1	3-ketoacyl-CoA thiolase	7,083542577	4,337	1	2	1	392	40,933	6,93	0,311	8,090908051	1
High	WP_013699340.1	LPS-assembly protein LptD	3,599634727	1,686	1	1	1	771	84,461	6,57	0,056	3,135210276	1
High	WP_017919957.1	Disulfide-bond oxidoreductase YghU	0,832978204	2,439	1	1	1	287	31,816	6,35	0,116	2,130529404	1
High	WP_013690901.1	AMP nucleosidase	2,767257937	3,74	1	1	1	508	57,308	7,21	0,086	5,158528328	1
High	WP_013691002.1	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 3	6,139132776	6,897	1	2	1	203	22,603	6,84	1,154	7,868011236	1
High	WP_165650591.1	Sarcosine oxidase subunit beta	1,760950907	2,899	1	1	1	414	45,289	7,9	0,101	3,614981174	1

Medium	WP_013691529.1	hypothetical protein	0,630784143	5,161	1	1	1	155	16,371	6,43	0,334	2,193362236	1
High	WP_013696393.1	Protein-methionine-sulfoxide reductase catalyt	1,759950228	2,719	1	1	1	331	36,949	9,39	0,122	2,038162708	1
High	WP_013699369.1	D-aminoacylase	1,995248844	2,648	1	1	1	491	52,511	5,68	0,083	2,627619982	1
High	WP_165650605.1	Rhamnosyltransferase 1 subunit A	1,365220542	3,39	1	1	1	295	33,158	6,54	0,129	2,350984097	1
High	WP_013689121.1	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase/4-	1,547446937	4,405	1	1	1	227	24,629	6,8	0,194	2,227887392	1
High	WP_013696654.1	hypothetical protein	0,989276135	9,286	1	1	1	140	15,06	6,79	0,389	3,891234159	1
High	WP_165651713.1	ATP synthase subunit c	2,35261703	12,36	1	1	1	89	9,085	7,99	0,778	3,266284943	1
High	WP_017919821.1	Cytochrome c-552	5,540972141	20,34	1	2	1	118	11,839	9,72	0,778	10,32964754	1
High	WP_017918715.1	Isoleucine--tRNA ligase	1,895854449	1,27	1	1	1	945	105,279	6,42	0,043	2,52615118	1
High	WP_017920408.1	Ferredoxin-dependent glutamate synthase 1	2,947306058	0,958	1	1	1	1566	170,651	6,71	0,024	3,352009058	1
High	WP_013690553.1	Formate dehydrogenase-O iron-sulfur subunit	4,202524712	4,934	1	1	1	304	33,188	5,96	0,155	4,177832127	1
High	WP_017920806.1	Proline/betaine transporter	0,80161787	1,591	1	1	1	440	46,999	9,64	0,129	1,859446526	1
High	WP_013699179.1	Adenylate kinase	2,22848601	5	1	1	1	220	24,224	6,62	0,166	3,601105213	1
High	WP_165651024.1	D-xylose-binding periplasmic protein	5,257431966	7,895	1	1	1	342	36,478	8,72	0,116	5,43300581	1
High	WP_013698814.1	Biopolymer transport protein ExbB	3,717377887	5,738	1	1	1	244	26,589	9,06	0,334	4,275923729	1
High	WP_013688826.1	Protein Ycel	1,700710666	6,726	1	1	1	223	23,663	7,56	0,212	2,643952847	1
High	WP_013690902.1	hypothetical protein	1,652279783	6,061	1	1	1	132	14,283	6,32	0,259	2,233943701	1
High	WP_017918989.1	hypothetical protein	1,087671642	2,572	1	1	1	311	35,039	6,28	0,155	2,54382062	1
High	WP_013690786.1	General stress protein 39	5,835052627	13,28	1	1	1	256	26,815	5,45	0,212	5,801530361	1
High	WP_013691153.1	Organic hydroperoxide resistance protein OhrE	0,996539468	9,79	1	1	1	143	14,704	6,55	0,233	2,660075665	1
High	WP_013698959.1	hypothetical protein	2,784626847	11,81	1	1	1	144	15,758	5,26	0,334	3,961052656	1
High	WP_013699128.1	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate red	1,524183587	4,294	1	1	1	326	35,345	5,87	0,122	3,134088755	1
High	WP_017918573.1	hypothetical protein	1,53313238	3,46	1	1	1	289	32,495	5,58	0,129	2,579558611	1
High	WP_013688937.1	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	3,962175249	3,982	1	1	1	452	47,414	6,42	0,086	4,37686491	1
High	WP_017918266.1	HTH-type transcriptional regulator RafR	1,76649624	3,933	1	1	1	356	37,469	8,16	0,101	3,482978582	1
High	WP_013690389.1	L-glyceraldehyde 3-phosphate reductase	4,729321164	5,81	1	1	1	327	36,165	6,1	0,122	3,899921656	1
Medium	WP_165651274.1	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransf	0,61672335	4,059	1	1	1	271	28,786	6,29	0,233	2,242509842	1
High	WP_013699466.1	Glutaredoxin 3	5,164246032	23,26	1	1	1	86	9,851	7,14	0,585	4,775598526	1
High	WP_165650639.1	hypothetical protein	3,862962545	1,239	1	1	1	1291	141,491	8,19	0,033	3,931863308	1
High	WP_013697075.1	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	2,984640245	5,161	1	1	1	310	31,822	5,22	0,155	3,264806271	1
High	WP_165651380.1	Malto-oligosyltrehalose trehalohydrolase	1,486649201	2,882	1	1	1	694	75,712	5,52	0,061	5,526975155	1
High	WP_165651049.1	hypothetical protein	2,901702464	5,782	1	1	1	294	34,327	8,37	0,136	3,537212133	1
High	WP_165652143.1	tRNA pseudouridine synthase A	0,985899678	7,22	1	1	1	277	30,803	8,03	0,145	3,617694616	1
High	WP_017919659.1	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-	4,270187493	13,22	1	1	1	174	18,295	6,27	0,468	5,227827072	1
High	WP_013690029.1	hypothetical protein	3,975514332	15,32	1	1	1	124	12,977	5,74	0,468	5,493372917	1
High	WP_013697931.1	putative diguanylate cyclase YeaP	8,341647029	4,938	1	2	1	324	36,066	5,74	0,233	7,308147907	1
High	WP_013689298.1	Glutarate-semialdehyde dehydrogenase DavD	1,946537395	2,869	1	1	1	488	51,671	6,35	0,083	3,135018349	1
High	WP_165651526.1	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	6,171275673	2,83	1	1	1	742	80,006	6,47	0,047	5,911642551	1
High	WP_165651623.1	Ferredoxin, 2Fe-2S	3,621965678	11,32	1	1	1	106	12,077	6,3	0,389	3,946058512	1
High	WP_013696642.1	Gluconokinase	1,796423225	4,762	1	1	1	168	18,613	6,11	0,259	2,682321787	1
High	WP_013698861.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	8,775049702	3,872	1	2	1	439	48,106	6,64	0,245	9,589969158	1
High	WP_013698247.1	Cytoskeleton protein RodZ	3,042105513	3,254	1	1	1	338	33,568	8,98	0,179	3,203257561	1
High	WP_165651695.1	Biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase 2	3,76700389	12,32	1	1	1	138	14,966	5,31	0,292	5,723498821	1
Medium	WP_017919029.1	hypothetical protein	0,747632486	3,774	1	1	1	159	18,292	5,29	0,585	2,34324646	1

High	WP_017919661.1	hypothetical protein	3,120846754	17,65	1	1	1	119	12,642	8,72	0,389	3,945878506	1
High	WP_013699243.1	N5-carboxyaminoimidazole ribonucleotide mut	0,955068454	7,558	1	1	1	172	18,017	7,72	0,292	2,186235905	1
High	WP_013690568.1	GDP-mannose 4,6-dehydratase	3,940058112	7,781	1	1	1	347	39,102	6,89	0,122	6,744380474	1
High	WP_013699477.1	hypothetical protein	2,683819901	14,12	1	1	1	85	9,823	8,56	0,334	3,140970707	1
High	WP_013699142.1	Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydroly	2,852323676	8,108	1	1	1	148	15,847	5,83	0,389	3,7838943	1
High	WP_017919662.1	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	5,396855627	9,859	1	1	1	284	30,625	6,32	0,129	6,353991032	1
High	WP_017919014.1	Beta-alanine--pyruvate aminotransferase	3,134500837	2,667	1	2	1	450	48,218	6,99	0,222	5,167487979	1
High	WP_013698863.1	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	1,615109203	1,918	1	1	1	417	47,597	6,7	0,096	2,039994955	1
High	WP_013691663.1	Dipeptidyl aminopeptidase BIII	1,024844022	1,125	1	1	1	622	68,355	6	0,072	1,856869102	1
High	WP_165651862.1	Low specificity L-threonine aldolase	3,544546031	8,58	1	1	1	338	35,431	6,35	0,129	5,481371403	1
High	WP_017919281.1	hypothetical protein	3,651111277	6,977	1	1	1	215	23,259	8,91	0,259	3,913897514	1
High	WP_165652298.1	hypothetical protein	2,393081474	7,051	1	1	1	156	16,889	4,96	0,233	3,176512003	1
High	WP_013690335.1	hypothetical protein	2,292941059	10,53	1	1	1	114	12,927	5,83	0,334	3,178774357	1
High	WP_013690383.1	60 kDa chaperonin	9,011310154	6,985	4	4	1	544	56,882	5,24	0,301	11,12325191	4
High	WP_017919669.1	hypothetical protein	1,935542011	2,375	1	1	1	421	48,633	7,36	0,105	2,268561363	1
High	WP_017920175.1	hypothetical protein	2,638272164	4,808	1	1	1	208	22,751	6,9	0,212	3,593193293	1
High	WP_017920713.1	Putative quercetin 2,3-dioxygenase	1,29542055	7,167	1	1	1	293	31,733	6,04	0,136	4,107801914	1
High	WP_013696459.1	hypothetical protein	2,408601449	6,13	1	1	1	261	28,963	7,49	0,145	3,596662283	1
High	WP_165651168.1	Signal peptidase I	2,906928694	6,734	1	1	1	297	33,953	6,4	0,116	3,061273813	1
High	WP_017918152.1	Ureidoglycolate lyase	3,993167508	7,746	1	2	1	284	31,111	5,26	0,468	7,909765959	1
High	WP_017918002.1	4-hydroxy-4-methyl-2-oxoglutarate aldolase/4-	1,720789487	4,741	1	1	1	232	23,706	6,55	0,166	2,814478874	1
High	WP_043218852.1	Alginate lyase	7,209574083	10,23	1	1	1	264	27,68	7,42	0,233	7,227791786	1
High	WP_013691643.1	Acyolphosphatase	1,515273196	9,184	1	1	1	98	11,223	8,69	0,389	3,446472883	1
High	WP_013697688.1	Glutamine--tRNA ligase	5,177155197	2,113	1	2	1	568	64,996	6,13	0,129	7,82388258	1
High	WP_012734508.1	Glutaredoxin 4	1,895512889	10,68	1	1	1	103	11,513	4,88	0,334	3,648468971	1
High	WP_017920448.1	hypothetical protein	4,690582774	6,971	1	1	1	373	38,496	8,32	0,116	5,004287243	1
Medium	WP_165651838.1	GTP 3',8-cyclase 1	0,794795636	4,663	1	1	1	386	43,522	8,34	0,105	0	1
High	WP_013691617.1	2-methylisocitrate lyase	4,326886896	7,407	1	1	1	297	31,851	5,43	0,129	3,965407848	1
High	WP_013690559.1	hypothetical protein	3,18124641	10,88	1	1	1	147	15,288	10,55	0,233	3,328081131	1
High	WP_013689559.1	Glycine betaine/carnitine transport binding pro	3,463946845	7,986	1	1	1	288	30,822	7,47	0,136	3,876416206	1
High	WP_165651506.1	Translocation and assembly module TamB	3,4405722	1,767	1	1	1	1075	110,939	9,51	0,034	3,703158617	1
High	WP_013689281.1	Gluconate 2-dehydrogenase cytochrome c subu	2,909389292	7,483	1	1	1	441	46,187	6,84	0,122	3,245781183	1
High	WP_165651886.1	hypothetical protein	1,054383721	3,537	1	1	1	311	32,988	7,21	0,145	2,76177597	1
High	WP_013691433.1	Esterase FrsA	2,98505965	4,918	1	1	1	305	33,648	8,03	0,194	2,760423899	1
High	WP_165650425.1	Outer membrane protein OprM	3,074791079	2,703	1	1	1	518	54,857	8,85	0,072	3,549574375	1
High	WP_017919528.1	1,2-phenylacetyl-CoA epoxidase, subunit A	2,599289363	3,274	1	1	1	336	37,249	6,62	0,129	2,58654213	1
High	WP_017918097.1	putative enoyl-CoA hydratase 1	10,1575986	11,9	1	2	1	168	18,259	6,18	0,52	11,44694138	1
High	WP_165651716.1	ATP synthase subunit alpha	3,9476909	2,534	1	1	1	513	55,56	5,86	0,08	4,18302393	1
High	WP_013689770.1	hypothetical protein	5,530767257	6,41	1	1	1	312	37,439	5,69	0,105	5,595167637	1
High	WP_013699082.1	hypothetical protein	1,842543232	4,721	1	1	1	233	24,244	9,2	0,166	3,531432629	1
High	WP_013698357.1	ABC transporter periplasmic-binding protein Yt	1,969805215	3,207	1	1	1	343	36,024	8,21	0,129	2,976842642	1
High	WP_165651502.1	Porphobilinogen deaminase	5,390832626	4,954	1	1	1	323	34,616	5,76	0,116	4,669779778	1
High	WP_017917940.1	Putative glutamate--cysteine ligase 2	2,784362437	3,235	1	1	1	371	41,75	5,63	0,116	2,597187519	1
High	WP_017918473.1	hypothetical protein	2,014843079	6,849	1	1	1	146	15,803	9,52	0,389	2,65073657	1

High	WP_013699649.1	Flagellar hook protein FlgE	5,914709422	5,556	1	1	1	414	42,17	4,61	0,292	4,946659565	1
High	WP_165651001.1	Dihydropolypyllysine-residue succinyltransferase	3,467372999	2,81	1	1	1	427	44,822	5,67	0,116	3,641527176	1
High	WP_013696780.1	Serine hydroxymethyltransferase 1	4,756218084	5,783	1	1	1	415	44,676	6,93	0,129	4,835053921	1
High	WP_165650890.1	Poly(3-hydroxyalkanoate) polymerase subunit F	4,61690307	3,549	1	1	1	648	70,976	5,55	0,077	4,301137924	1
High	WP_013699728.1	Exodeoxyribonuclease	1,93516778	3,891	1	1	1	257	29,138	7,15	0,155	2,513220549	1
High	WP_017920470.1	Elongation factor Ts	7,280993478	8,532	1	2	1	293	31,156	5,36	0,259	10,04432678	1
High	WP_165650612.1	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	15,41906137	1,826	1	2	1	1369	152,977	5,62	0,059	13,56816912	1
High	WP_165651684.1	hypothetical protein	2,00344455	8	1	1	1	150	17,336	6,14	0,259	3,059536219	1
High	WP_013696789.1	hypothetical protein	2,854492829	11	1	1	1	100	10,817	8,97	0,468	3,543794155	1
Medium	WP_165652179.1	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	0,668167956	4,274	1	1	1	468	50,31	6,1	0,105	2,45554924	1
Medium	WP_017919122.1	Phosphomethylpyrimidine synthase	0,755970411	2,488	1	1	1	643	71,048	6,02	0,051	0	1
High	WP_165651749.1	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3,159956669	4,844	1	1	1	289	29,98	5,97	0,259	4,213703156	1
High	WP_013697397.1	RNA polymerase sigma-54 factor	1,930701988	2,68	1	1	1	485	53,676	7,08	0,08	3,21099925	1
High	WP_013699472.1	HPr-like protein Crh	3,377682339	14,61	1	1	1	89	9,545	6	0,585	3,637102604	1
High	WP_017919005.1	hypothetical protein	6,215259069	9,353	1	2	1	139	14,636	6,89	1,512	6,641544342	1
High	WP_165651523.1	Multicopper oxidase mco	2,95546024	2,264	1	1	1	530	57,663	7,12	0,075	2,588072777	1
High	WP_165650925.1	Polyketide biosynthesis malonyl CoA-acyl carrie	4,476123524	7,692	1	1	1	377	40,404	5,74	0,145	5,483774185	1
High	WP_165650928.1	Polyketide synthase PksL	4,188894393	0,306	1	1	1	6526	693,914	6,57	0,006	4,775634766	1
High	WP_017918572.1	Arginine biosynthesis bifunctional protein ArgJ	3,785686103	3,874	1	1	1	413	43,298	5,76	0,093	5,442596912	1
High	WP_013699244.1	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxa	2,294478387	3,378	1	1	1	296	32,789	5,12	0,105	2,415017605	1
High	WP_013689790.1	Spermidine/putrescine-binding periplasmic pro	4,71489297	4,611	1	1	1	347	37,765	8,18	0,129	3,163725853	1
High	WP_017919425.1	Argininosuccinate synthase	3,409492538	3,218	1	1	1	404	44,414	5,71	0,101	3,794079542	1
High	WP_165650997.1	Type II secretion system protein D	2,058091226	2,096	1	1	1	477	48,359	8,29	0,101	3,013511658	1
High	WP_165650619.1	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	3,555486794	4	1	1	1	325	35,759	6,07	0,105	3,696792364	1
High	WP_013696587.1	Outer membrane lipoprotein pcp	14,97519361	19,62	1	2	1	158	15,503	9,72	0,931	13,89512205	1
High	WP_017918574.1	Cell division protein ZapD	1,10419085	2,789	1	1	1	251	28,834	6,24	0,136	2,451987505	1
High	WP_013696535.1	1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	3,038483989	2,837	1	1	1	564	59,935	5,72	0,083	4,741276741	1
High	WP_013696515.1	Ribosome-binding ATPase YchF	3,495665088	6,593	1	1	1	364	39,13	5,11	0,11	3,746171713	1
High	WP_017920626.1	Amino-acid acetyltransferase	1,507938395	5,495	1	1	1	455	49,555	5,85	0,136	3,459956884	1
High	WP_013698206.1	Outer membrane protein W	0,958212681	4,225	1	1	1	213	22,886	8,06	0,259	2,392403126	1
High	WP_013696382.1	30S ribosomal protein S13	1,668572703	7,438	1	1	1	121	13,612	11,22	0,389	2,62817955	1
High	WP_013691021.1	hypothetical protein	1,565750548	5,714	1	1	1	140	14,631	5,25	0,468	2,30432868	1
High	WP_017919879.1	Serine/threonine-protein kinase pkn1	9,519444065	6,422	1	2	1	327	35,69	5,29	0,259	8,386924267	1
Medium	WP_013696130.1	Type II secretion system protein G	0,740167301	9,333	1	1	1	150	16,752	8,38	0,292	3,223758221	1
High	WP_017919347.1	Carboxylesterase NlhH	3,258927228	6,017	1	1	1	349	37,216	6,65	0,116	4,85451746	1
High	WP_013698293.1	ABC transporter arginine-binding protein 1	4,669180534	9,302	1	1	1	258	27,575	9,04	0,179	5,348374367	1
High	WP_013699267.1	Protein RecA	5,123353563	3,9	1	2	1	359	38,436	5,08	0,233	6,182525873	1
High	WP_013690720.1	Deoxyribose-phosphate aldolase 1	3,464832515	5,752	1	1	1	226	22,906	5,6	0,179	3,538729906	1
High	WP_013698953.1	Cytochrome c-554(548)	6,806998859	10,66	1	2	1	122	13,21	8,32	0,778	7,017299652	1
High	WP_017919743.1	hypothetical protein	1,39739748	6,87	1	1	1	131	14,741	5,82	0,292	2,973188639	1
High	WP_165651165.1	Transcriptional regulatory protein ZraR	1,833569886	3,004	1	1	1	466	51,018	6,19	0,089	2,960134029	1

EXTRACELLULAR PROTEINS

RefSeq (NCBI)	Protein name	EC number	Protein description	BLAST (NCBI)	Identity
WP_017919781.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF4019 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	98,9%
WP_165650587.1	Gamma-glutamyltranspeptidase	3.4.19.13	Peptidases	-	
WP_165650779.1	hypothetical protein	3.4.16	Peptidases	peptidase S10 [Burkholderia gladioli]	99,5%
WP_013689260.1	3-oxoadipate enol-lactonase 2	3.1.1.24	Other Carboxylesterases	-	
WP_017919041.1	Aldose 1-epimerase	5.1.3.3	Isomerases	-	
WP_043218641.1	Endoglucanase E1	3.2.1.4	Glycosidases	-	
WP_165650775.1	Exo-beta-1,3-glucanase	3.2.1.58	Glycosidases	-	
WP_017919207.1	PE-PGRS family protein PE_PGRS18	-	Other	-	
WP_017919661.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,2%
WP_017921361.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	5.2.1.8	Isomerases	-	
WP_013698334.1	putative parvulin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	5.2.1.9	Isomerases	-	
WP_013698213.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,5%
WP_017920870.1	Aminopeptidase N	3.4.11.2	Peptidases	-	
WP_013697810.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF1571 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,7%
WP_013697791.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF2147 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,4%
WP_165651042.1	Catalase	1.11.1.6	Oxidoreductases	-	
WP_036052013.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	MULTISPECIES: DUF4397 domain-containing protein [unclassified Burkholderia]	99,6%
WP_017921169.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF4142 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,5%
WP_013697258.1	hypothetical protein	-	Other	CHRD domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,3%
WP_013697190.1	Putative peroxiredoxin bcp	1.11.1.24	Oxidoreductases	-	
WP_013696773.1	Dipeptidyl-peptidase 5	3.4.14	Peptidases	-	
WP_017920448.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,7%
WP_165651368.1	Gamma-glutamyltranspeptidase	3.4.19.13	Peptidases	-	

WP_165651374.1	Chitosanase	3.2.1.132	Glycosidases	-	
WP_165651386.1	hypothetical protein	3.4.16	Peptidases	serine-type carboxypeptidase family protein [Burkholderia gladioli BSR3]	99,8%
WP_165651430.1	putative bifunctional chitinase/lysozyme	3.2.1.14/17	Glycosidases	-	
WP_017921988.1	Ecotin	-	Other	-	
WP_013699082.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	SIMPL domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,6%
WP_165651523.1	Multicopper oxidase mco	1	Oxidoreductases	-	
WP_017921762.1	hypothetical protein	3.4.17	Peptidases	MULTISPECIES: carboxypeptidase regulatory-like domain-containing protein [Burkholderia]	99,3%
WP_165651549.1	Esterase EstA	3.1.1.1	Esterases/Lipases	-	
WP_165651554.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	MULTISPECIES: DUF2501 domain-containing protein [Burkholderia]	99,4%
WP_017920175.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,5%
WP_013699377.1	hypothetical protein	-	Other	CHRD domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,3%
WP_013699469.1	putative CtpA-like serine protease	3.4.21	Peptidases	-	
WP_165651650.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,5%
WP_017920318.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	MULTISPECIES: hypothetical protein [Burkholderia]	99,3%
WP_017919529.1	hypothetical protein	3.1.1.1/3	Esterases/Lipases	SGNH/GDSL hydrolase family protein [Burkholderia gladioli]	99,8%
WP_017919347.1	Carboxylesterase NIhH	3.1.1.1	Esterases/Lipases	-	
WP_017919182.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,8%
WP_017920210.1	Dipeptidyl aminopeptidase BII	3.4.14	Peptidases	-	
WP_017918473.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,3%
WP_165651909.1	2-pyrone-4,6-dicarboxylate hydrolase	3.1.1.57	Other Carboxylesterases	-	
WP_165651940.1	Thermostable beta-glucosidase B	3.2.1.21	Glycosidases	-	
WP_043218852.1	Alginate lyase	4.2.2.3	Lyases	-	
WP_165651946.1	hypothetical protein	3.2.1	Glycosidases	GH92 family glycosyl hydrolase [Burkholderia gladioli]	95,8%
WP_017919552.1	Bacterial leucyl aminopeptidase	3.4.11.10	Peptidases	-	
WP_165651964.1	putative inactive lipase	3.1.1.3	Esterases/Lipases	-	

WP_043217571.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF2599 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,8%
WP_017920186.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein bgla_2g23690 [Burkholderia gladioli BSR3]	99,3%
WP_013691021.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,3%
WP_017920515.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,3%
WP_013690902.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,2%
WP_013690633.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	MULTISPECIES: hypothetical protein [Burkholderia]	88,3%
WP_017919251.1	hypothetical protein	-	Unknown Function	DUF2957 domain-containing protein [Burkholderia gladioli]	99,8%
WP_165652138.1	Lipase	3.1.1.3	Esterases/Lipases	-	
WP_013690599.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,4%
WP_017918889.1	putative bifunctional chitinase/lysozyme	3.2.1.14/17	Glycosidases	-	
WP_017920760.1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	3.2.1.39	Glycosidases	-	
WP_013690287.1	hypothetical protein	3.2.1.14	Glycosidases	chitinase [Burkholderia gladioli]	99,7%
WP_165652262.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,2%
WP_013689993.1	Beta-lactamase Toho-1	3.5.2.6	Amidases	-	
WP_017921902.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,0%
WP_013689950.1	hypothetical protein	-	Hypothetical	hypothetical protein [Burkholderia gladioli]	99,6%

(%)	Quantity	Protein description
14,1%	9	Peptidases
1,6%	1	Amidases
7,8%	5	Esterases/Lipases
3,1%	2	Other Carboxylesterases
14,1%	9	Glycosidases
4,7%	3	Oxidoreductases
4,7%	3	Isomerases
1,6%	1	Lyases
15,6%	10	Unknown Function
26,6%	17	Hypothetical
6,3%	4	Other
total	64	

ANEXO IV – Sequências dos genes *Lip* (fonte maiúscula) e *Lif* (fonte minúscula) de *Burkholderia gladioli* BRM588833. O destacado sublinhado representa a sequência do peptídio sinal. O nucleotídeo marcado em vermelho representa a sobreposição do fim de *LIP* e do início de *LIF*. Fragmento de 2123 pb.

ATGCGCAGATCGATGCGTTCGAGGCTGGCGGCGAGGGCGGTGGCATGG
GCGCTGGCGGCGATGCCGCTGGCCGGGGCGGCGGGCCTGGCGATGACG
GCGGCGCCCGCGGCGATGGCGGCCGATACTATGCGGCGACGCGCTAT
CCGGTGATCCTGGTGCACGGCCTGGCCGGCACCGACAAGTTCGCGAATG
TGCTCGACTACTGGTACGGCATCCAGAGCGACCTGCAATCGCATGGCGCG
AAGGTCTACGTGGCCAACCTGTCCGGCTTCCAGAGCGACGACGGCCCGA
ACGGCCGTGGCGAGCAGTTGCTGGCCTACGTCAAGCAGGTGCTGGCAGC
CACCGGCGCGACCAAGGTCAACCTGATCGGCCACAGCCAGGGCGGGCTG
ACCTCGCGCTACGTGGCGGCGGTGCGGCCGCAACTGGTGGCTTCGGTGA
CCACCATCGGCACGCCGCATCGCGGCTCCGAGTTCGCCGATTTCTGTGCA
GGGCGTGCTGGCGACCGATCCCACCGGCTGTGTCGACGGTGATCGCC
GCCTTCGTCAACGTGTTCCGGCACGCTGATCAACAGCTCGCTGAACACCAA
CCAGGACGCGCTGGCCGCGCTCAAGACACTGACCACCGCGCAGACGGCC
GCCTACAACAAGAACTTCCCGAGCGCCGGGCTCGGCGCGCCGGGCACGT
GCCAGACGGGAGCGGCGACCGAAACCGTCCCGGGCAACCAGCACCTGCT
CTATTCCTGGGGCGGCACGGCGATCCAGCCGGGCGCGACCGTGCTCGGC
GTGACGGGCGCGAGCGATAACCAGCACCTTCGACTCGGCCAACG
TCACCGATATCTCGACGTTGGCCCTGCTCGGCACCGGCGCGGTGATGATC
AATCGCGGCTCGGGCCAGAACGACGGGCTGGTGTGCGCGCTGCAGCTCGC
TGTTCCGGCCAGGTGATCAGCACCGCTACCACTGGAACCACCTCGACGAG
ATCAACCAGTTGCTCGGCGTGACGGCGCGAATGCCGAGGATCCGGTCCG
CGGTGATCCGCACGCACGTGAACCGCCTCAAGCAGCAGGGCATCTGAtggt
gcgatccgatcgctccggtgcgcgccgcgcgggccgggcgcgctgctgcgggcgagcggcttcgctg
cgccggcgcgatcgctggtggtactgcccgggcgcgagcctcgccacgacgcgccgcggtcggt
gctccgcaaccgttcggcgagcgacgggaggtgggggagggcgccgctggccgccacgctgccg
gcctcgctggctggtccagcgcgccgcgctgcccctcgatgccggcgagcggctggcgaggacgcgcg
ggtgcgcgacttctcgactactgctgagcgcgacgacacctcacgcccggccgggctcgacgcgctggt
gctgcgcgagatcgccgcaactggagggcagcccggcgcgagcaggacgctcgatgctggcaacg
ctatcgcgctatttcgatggactcgcgcggtgcccggcgggctcggtgctcgggcacaagctcgatccg
gccgcatgcagctcgcgctcgaacagcgcgacgctggccagccgcacgctcggcgaatgggcccag
cccttctggcgaggagcagcgccgagcggtcgacctggagcggatccgatcgcgcgatcccgc
gctcagcgacgagcagaaggccgcgcgctggccgctcgatgcgcaactgacgcccggccgagcgcg
cgcagcaggcggcgatccgtgcccagcaggatgccgtgtcgaagatcgcgccatgcagcaggccggcg
cgacgcccggagcagatgcgcccagctcgcgagggcgtcgggcccagggcagccgcgcgccgccc
aagctgcagcaggacgacgatgctggcagggcgctaccaggcctatcgggccgaacgcatcggttc
tcgcgaggggctgcacccgacgatcgcgacgcgcgatcgcgcgagttgcccagcagaccttaccga
gcccggcgaggcgattcgcgggcctcgctcgatcgcgcgctcgcgcgggcgggta