

**Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN**  
**Instituto de Química – IQ**  
**Departamento de Bioquímica**

**Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica*  
em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de  
*escala***

**Julia de Macedo Robert**

Rio de Janeiro

2015

**Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ**  
**Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN**  
**Instituto de Química – IQ**  
**Departamento de Bioquímica**

**Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica*  
em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de  
escala**

**Julia de Macedo Robert**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Antônio Carlos de Oliveira Machado

Rio de Janeiro

2015

C331

Robert, Julia de Macedo.

Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala/ Julia de Macedo Robert. – Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2015.

108f.: il.

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire

Antônio Carlos de Oliveira Machado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro, 2015.

1. *Pichia Pastoris*. 2. Lipase B de *Candida antarctica*. 3. Melhorias em meio de cultivo. 4. Glicerina loira. 5. Promotor constitutivo pPGK. I. Freire, Denise Maria Guimarães. (Orient). II. Machado, Antônio Oliveira de. (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala.

**Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala**

Julia de Macedo Robert

Orientadores: Denise Maria Guimarães Freire  
Antônio Carlos de Oliveira Machado

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

---

Presidente:

Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire Instituto  
de Química – UFRJ

---

Prof Dr. Francisco Valero Barranco  
Escola de engenharia – UAB

---

Prof Dr. Fernando Araripe Gonçalves Torres  
Instituto de Ciências Biológicas – UNB

---

Prof. Dr. Viridiana Santana Ferreira Leitão  
Instituto Nacional de Tecnologia – INT

Aos meus pais, Denize e José Carlos,  
obrigada pela perfeita combinação entre  
pressão e suporte, amo vocês.

## **Agradecimentos**

O tempo foi muito curto mas o caminho foi beem longo! A conclusão desta dissertação é um grande marco em minha vida e com certeza não seria possível sem ajuda e por isso gostaria de agradecer especialmente a algumas pessoas.

Primeiramente a minha mãe e meu pai, sem eles não existiria dissertação, não existiriam objetivos, não existiria minha vida. Vocês me ensinaram a lutar pelos meus objetivos e passar por cima das "pedras no caminho", a perfeita combinação entre apoio e pressão. Obrigado por me dar espaço e não cobrar minha presença mesmo quando a saudade apertava!

Ao meu namorado, Guilherme, por ser o melhor companheiro do mundo, por toda compreensão das minhas ausências, pela calma com meus ataques nervosos e por todo amor em todos os momentos;

Aos meus orientadores: professora Denise por ser minha inspiração profissional, pelos incentivos e entusiasmo; e Antônio por ser MUITO mais que um orientador, é professor, é conselheiro, é amigo, é alguém que eu nunca mais vou esquecer, palavras não são meu forte como você bem sabe, mas espero que sinta tudo isso, você vai fazer muita falta!

Aos amigos, Fabio e Douglas, pelo companheirismo, pelas risadas, por alegrar os longos dias de trabalho e, claro, pelos litros de água destilada carregados HAHAHA, amo vocês!!

A toda a equipe do Labim, o melhor e mais animado laboratório para se trabalhar!

Ao professor Tito Livio por disponibilizar as instalações do laboratório de bioprocessos do programa de engenharia química da COPPE e à Mônica Yumi pela ajuda em me ambientar no laboratório e me receber tão bem toda vez, mesmo com tantas trocas de datas e equipamentos "sentimentais";

Ao Cnpq pela bolsa de mestrado;

“Nothing is true  
Everything is permitted”  
*Assassin’s Creed series*

Produção de lipase recombinante (Lip B) de *Candida antarctica* em  
*Pichia pastoris*: Avaliação de meio de cultivo e aumento de escala

Julia de Macedo Robert

Denise Maria Guimarães Freire Antônio

Carlos de Oliveira Machado

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

As lipases apresentam uma grande versatilidade de propriedades, tais como termoestabilidade, resistência a solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereoseletividade, razão pela qual sua participação no mercado mundial de enzimas industriais vem crescendo significativamente. Entretanto, as lipases comerciais disponíveis no mercado são importadas e de elevado custo, o que inviabiliza a utilização deste biocatalisador em aplicações em larga escala ou para produção de “commodities”.

Deste modo, a ampla utilização de lipases no setor industrial nacional requer como premissa básica a redução de seus custos de produção. Dentre as estratégias utilizadas para este fim está o aumento da concentração e produtividade da enzima no meio de cultivo e o uso de resíduos agroindustriais na produção de lipase B de *Candida antarctica*. Neste trabalho a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* foi utilizada como hospedeira para expressão heteróloga, associado a um promotor constitutivo pPGK, da enzima Lipase B de *Candida antarctica* (CalB). O meio e os parâmetros de cultivo bem como o modo de condução do processo foram investigados visando o aumento da produtividade enzimática com concomitante diminuição de custos de produção. Os cultivos tiveram controle de temperatura e pH ajustados automaticamente, e



a agitação e vazão de ar variaram na faixa entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, de acordo com necessidade definida por uma cascata com o objetivo de manter um nível de 30% de saturação de oxigênio dissolvido no meio.

Na melhor condição de cultivo (meio mínimo de sais, 100 g/L de glicerina loira inicial, 30°C, pH 7), em batelada alimentada com pulso único de glicerina loira, foi possível alcançar um aumento de 50,6% e 4,7 vezes na produtividade e na atividade, com valores finais de 18,5 U/g.h e 28.733 U/L, respectivamente. O custo final do meio de cultivo foi reduzido em 97%, tornando possível aumentar o cultivo até a escala piloto de 100L.

Palavras-chave: *Pichia Pastoris*; Lipase B de *Candida antarctica*; Melhorias em meio de cultivo; glicerina loira; aumento de escala; Promotor constitutivo pPGK.

# Recombinant lipase production (LipB) from *Candida antarctica* on *Pichia pastoris*: Cultivation medium evaluation and scale up

Julia de Macedo Robert

Denise Maria Guimarães Freire Antônio

Carlos de Oliveira Machado

*Abstract* da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências – Bioquímica.

Lipases have great properties versatility as such thermal stability, resistance to organic solvents, specificity, regioselectivity and stereoselectivity. These are the reasons why its participation on world market of industrial enzymes is growing significantly. However, the commercial lipase available on the market are imported and have a high cost, which makes the utilization of the biocatalyst not possible to large scale applications or to production of least valuable products, called commodities.

Therefore, the wide use of lipase on the national industrial sector requires low production costs. Among the strategies used to obtain the reduction of this cost is the increase of concentration and productivity of the enzyme on the cultivation media and the use of agribusiness residues.

On this work the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* was used as host for the heterologous expression, associated with the constitutive promoter pPGK, of the Lipase B enzyme from *Candida antarctica* (CalB). The cultivation media and parameters as the operation modes of the process were investigated aiming the increase of enzymatic productivity and the reduction of production costs. The fermentation had temperature and pH controls automatically adjusted. A cascade controller try to maintain 30% of dissolved oxygen on the media by adjusting stirring and aeration between 250-700 rpm and 0-1 vvm, respectively.

The best cultivation condition (salts medium, 100 g/L of initial crude glycerin, 30°C and pH7), using feed batch with single pulse as operation mode, showed a 50,6% increase on the productivity and a 4,7 fold increase on the activity, reaching the results of 18,5 U/g.h e 28.733 U/L. The final cost was reduce on 97%, making it possible to scale up the production successfully to a pilot plant with 100L capacity.

Keywords: *Pichia Pastoris*; Lipase B from *Candida antarctica*; Improvements on cultivation media; crude glycerin; scale up aumento de escala; Promotor constitutivo pPGK.

## Sumário

1.	Introdução .....	1
2.	Revisão Bibliográfica .....	3
2.1.	Enzimas .....	3
2.2.	Mercado de enzimas .....	4
2.3.	Lipase .....	6
2.4.	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> .....	9
2.5.	Aplicações das lipases.....	11
2.6.	A levedura <i>Pichia pastoris</i> .....	13
2.7.	Tipos de promotores para proteínas recombinantes .....	14
2.7.1.	Produção não associada ao crescimento .....	14
2.7.2.	Produção associada ao crescimento.....	15
2.7.3.	Aplicações dos promotores de <i>Pichia pastoris</i> .....	17
2.8.	Processos fermentativos .....	18
2.9.	Modos de condução de processos fermentativos.....	19
2.9.1.	Batelada.....	19
2.9.2.	Batelada alimentada.....	20
2.9.3.	Contínuo .....	21
2.10.	Parâmetros que influenciam o processo e podem ser controlados .....	22
2.10.1.	Composição do meio .....	22
2.10.2.	Temperatura .....	23
2.10.3.	pH .....	24
2.10.4.	Concentração de oxigênio dissolvido .....	24
2.11.	Aumento de escala da produção .....	25
2.12.	Glicerina bruta .....	26
2.12.1.	Obtenção .....	26
2.12.2.	Mercado .....	29
2.12.3.	Utilização .....	30
3.	Objetivo .....	33
3.1.	Geral.....	33
3.2.	Objetivos específicos .....	33
4.	Materiais e métodos .....	33

4.1.	Materiais.....	33
4.2.	Micro-organismo .....	34
4.3.	Estocagem e inóculo .....	34
4.4.	Meios de Cultivo.....	35
4.5.	Condições de cultivo.....	36
4.6.	Medida de concentração celular .....	37
4.7.	Medida de atividade lipásica por meio espectrofotométrico.....	37
4.8.	Medida de atividade lipásica por meio titulométrico.....	38
4.9.	Concentração de proteínas totais .....	40
4.10.	Concentração de nitrogênio.....	40
4.11.	Concentração de glicérol.....	40
4.12.	Eletroforese em gel de resolução .....	40
4.13.	Cálculo dos parâmetros .....	41
5.	Resultados e Discussão.....	42
5.1.	Definição do meio de cultivo .....	42
5.2.	Comparação entre meios quimicamente definidos em biorreator .....	44
5.3.	Avaliação da fonte de carbono .....	48
5.4.	Estudo da concentração inicial de substrato.....	52
5.5.	Efeito da concentração de inóculo .....	56
5.6.	Efeito da temperatura.....	58
5.7.	Avaliação das condições de oxigenação .....	62
5.8.	Estratégias de condução do cultivo.....	66
5.9.	Escalonamento da Produção.....	72
6.	Conclusão .....	77
7.	Perspectivas Futuras.....	78
8.	Referências Bibliográficas.....	78

## Índice de figuras

Figura 1: Mercado mundial de enzimas em 2002, 2007 e 2012 com projeções para 2017 e 2022. (Estudo industrial do grupo Freedonia, 2014) .....	4
Figura 2: Mercado mundial de enzimas dividida por mercados, em 2012 (Estudo industrial do grupo Freedonia, 2014).....	5
Figura 3: Reação de hidrólise catalisada por lipase .....	6
Figura 4: Mecanismo de transesterificação da reação catalisada por lipase. A tríade catalítica está numerada de acordo com a enzima Cal B de Candida antarctica. (Traduzido de Simas et al., 2011).....	8
Figura 5: Estrutura tridimensional da Lipase B de Candida antarctica, enfatizando a tríade catalítica (em azul) e as estruturas secundárias alfa hélice e folha beta. ....	10
Figura 6: Proposta de fluxo metabólico do metanol durante a etapa de indução em cultura de Pichia pastoris. (Kim et al, 2013) .....	15
Figura 7: Via glicolítica, em destaque nos quadrados pretos onde glicose e glicerol começam a ser metabolizados, em destaque os quadrados azuis a localização dos dois promotores constitutivos citados (GAP e PGK) (modificado de Pelicano et al, 2006).....	17
Figura 8: Reação de transesterificação metílica para produção de biodiesel (GERPEN et al, 2004) .....	27
Figura 9: Fluxograma do processo de produção de biodiesel (PARENTE, 2003) .....	28
Figura 10: Produção de glicerina bruta segundo o biodiesel de 2005 a 2013 (ANP/SPD conforme resolução ANP n° 17/2004) .....	30
Figura 12: Aplicações tradicionais da glicerina em porcentagem mundial (STELMACHOWSKI, 2011).....	31
Figura 13: Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato por lipases .....	37
Figura 14: Reação de hidrólise da tributirina catalisada por lipase .....	39
Figura 15: Comparação dos parâmetros obtidos após 24h de crescimento nos meios YPD 2%, BSM e mínimo com glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração	

variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	43
Figura 16: Cinética do cultivo de <i>P.pastoris</i> utilizando meio BSM com 40g/L de glicerol iniciais a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	45
Figura 17: Cinética do cultivo de <i>P.pastoris</i> utilizando meio mínimo com 40g/L de glicerol iniciais a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	46
Figura 18: Produtividade, atividade e atividade específica obtidas com meio BSM e mínimo com 40g/L de glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	48
Figura 19: Acompanhamento de fermentações com meio mínimo e glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	50
Figura 20: Produtividade, atividade e atividade específica obtidas com meio mínimo utilizando 40g/L de glicerol e glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	51
Figura 21: Comparação entre parâmetros de fermentação nas diferentes concentrações iniciais de carbono (40, 60, 80, 100 e 150 g/L) a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	53
Figura 22: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira como fonte de carbono a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo	

com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.....	55
Figura 23: Acompanhamento do consumo de glicerol e crescimento celular com inóculo inicial de 1, 1,5 e 2g/L a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	57
Figura 24: Parâmetros obtidos ao final do cultivo em 20, 30 e 35°C com 100g/L de glicerina loira, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.....	59
Figura 25: Eletroforese em gel de resolução do sobrenadante obtido ao final das fermentações em 20, 30 e 35°C com 100g/L de glicerina loira, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	61
Figura 26: Padrão de oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Pichia pastoris</i> em batelada aerada com ar comprimido com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	62
Figura 27: Padrão de oxigênio dissolvido em cultivo de <i>Pichia pastoris</i> em batelada aerada com oxigênio puro com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	63
Figura 28: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira aerado com oxigênio puro a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	64
Figura 29: Parâmetros obtidos ao final do cultivo com aeração de ar comprimido e oxigênio puro em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700	



rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	65
Figura 30: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. Área destacada indica o momento da alimentação. (A) Alimentação feita ao meio da fase exponencial. (B) Alimentação feita ao meio da fase exponencial. ....	67
Figura 31: Parâmetros obtidos ao final do cultivo após alimentação em diferentes momentos da fase exponencial de crescimento em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	69
Figura 32: Parâmetros obtidos ao final do cultivo após alimentação ao meio da fase exponencial com diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 g/L) em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	71
Figura 33: Biorreator em escala piloto utilizado da marca infors .....	73
Figura 34: Acompanhamento das variáveis de processo em meio mínimo com 100g/L de glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. (verde escuro) agitação. (azul) pH. (amarelo) temperatura. (rosa) Oxigênio dissolvido. (verde claro) aeração. ....	74
Figura 35: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira em escala piloto a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. .....	75
Figura 36: Parâmetros obtidos ao final do cultivo em batelada em escala piloto em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira em escala piloto a 30°C, pH 7,	

agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30% em comparação a uma batelada no biorreator de 5L nas mesmas condições..... 76

## Lista de abreviaturas

pAOX = promotor associado a enzima aldeído oxidase

pGAP = promotor associado a enzima gliceraldeído 3- fosfato

pPGK = promotor associado a enzima fosfoglicerato quinase

FS = fermentação submersa

FES = fermentação no estado sólido

OD = oxigênio dissolvido

$Y_{p/x}$  = rendimento de atividade de lipase produzida por biomassa obtida

$\mu$  = taxa específica de crescimento

$Q_p$  = produtividade mássica

$U_{esp}$  = atividade específica

# 1. Introdução

O crescimento populacional e o desenvolvimento tecnológico somado com o uso exagerado dos recursos naturais proporcionam um desequilíbrio ambiental com o aumento desordenado na produção de resíduos. Assim, o mal gerenciamento dos resíduos gerados em diversos setores produtivos da sociedade vem criando uma oportunidade para o uso de estratégias biotecnológicas. Dentre estas estratégias as enzimas representam um dos pontos mais importantes para a transformação de matérias-primas em produtos biotecnológicos de alto valor agregado.

O aumento da pesquisa e desenvolvimento de atividades; pressão de órgãos ambientais para reduzir a poluição; desejo de aumentar os lucros reduzindo os custos de manufatura e os avanços biotecnológicos tem colocado o mercado de enzimas cada vez mais em evidência e, desta forma, processos enzimáticos estão se tornando mais viáveis economicamente e são alternativas ecológicas para os processos químicos tradicionais (Bcc Research, 2014).

As enzimas vem ganhando destaque com amplo e crescente mercado que em 2012 movimentou cerca de 5130 milhões de dólares e com previsão de crescimento de 6.3% ao ano, segundo estudos do grupo Freedonia (Grupo Freedonia, 2014). No caso específico das lipases estas possuem uma ampla gama de utilizações, que vão desde a produção de biodiesel e uso como aditivos em sabões em pó até resolução de mistura racêmicas para produção de fármacos e produção de biolubrificantes. Tais aplicações só são possíveis devido às diversas reações que estas enzimas podem catalisar, dentre as quais podem ser destacadas: hidrólise, esterificação, transesterificação, acidólise, aminólise etc. No grupo destas enzimas a lipase B de *Candida Antarctica* (LipB) é um dos biocatalisadores mais amplamente utilizados em síntese orgânica, pois além de apresentar alta atividade e estabilidade em meios aquosos e aquo restritos possui especificidades variáveis frente a diversos substratos e é extremamente eficiente em síntese de ésteres.

Entretanto, a levedura *Candida antarctica* selvagem não é capaz de produzir esta enzima em elevadas concentrações com produtividade satisfatória. Deste modo, uma das estratégias passíveis de ser empregada é a utilização da levedura *Pichia pastoris*, como plataforma de expressão heteróloga desta enzima. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é considerada a plataforma de expressão eucariótica para proteínas mais utilizada no meio científico, tanto em processos em pequena escala (laboratoriais) quanto na indústria. Dentre as características que tornam este microrganismo uma plataforma de expressão interessante podemos destacar: uso de meios de cultivo e condições de processo simples; fácil de manipular geneticamente; poder atingir altos níveis de expressão proteica (intra e extracelular), além de ser capaz de fazer modificações pós-traducionais como: glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e proteólise. Além disso, esta levedura pode crescer até altas densidade celulares, preferencialmente em processos aeróbios e a proteína secretada é mais facilmente purificada, já que o nível de diferentes proteínas secretadas naturalmente no meio é baixo (Cregg *et al.*, 2000).

O modo de produção para biomoléculas secretadas por *Pichia pastoris* está atrelada ao promotor com o qual o gene é ligado, sendo o mais estudado o AOX (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2013; Potvin *et al.*, 2012). Neste caso, a ativação do gene inserido é dependente da indução com metanol e deve ser precedido de uma etapa de crescimento de biomassa. No entanto, as diversas etapas envolvidas, bem como o uso de metanol tornam a ampliação de escala muito complexa e dependendo do produto até mesmo inviável. Visando suplantiar os inconvenientes dos processos que se utilizam do promotor AOX, promotores de expressão constitutiva vem sendo bastante explorados, já que é possível obter produção associada ao crescimento facilitando o processo. O promotor constitutivo PGK, referente a enzima fosfoglicerato kinase I, que é regulado pela via glicolítica será utilizado no presente trabalho. Por outro lado apesar de ser uma plataforma de expressão bastante versátil a eficiência de produção não depende somente do micro-organismo, mas também do meio de cultivo e principalmente das condições do processo. Desta forma, estratégias de produção objetivando o cultivo em altas densidades celulares de *Pichia pastoris*,

expressando biomoléculas recombinantes com promotor constitutivo, são muito importantes já que a expressão da biomolécula é associada ao crescimento.

Portanto, a proposta aqui apresentada visou o aumento da produtividade da lipase recombinante (CalB) de *Candida antarctica* expressa em *Pichia pastoris*, contemplando utilização de meios de baixo custo contendo um resíduo (glicerina bruta) como fonte de carbono, além do estudo de diferentes estratégias de processo para aumento de densidade celular e finalmente a ampliação de escala até unidade piloto (100L) nas condições de processo anteriormente definidas.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Enzimas**

Enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza proteica que apresentam atividade catalítica e que podem estar associadas a outros tipos de moléculas como carboidratos e lipídios. Algumas enzimas requerem ligação com cofatores para fazer corretamente sua função de catálise. O poder catalítico de uma enzima está relacionado a energia livre liberada da formação de ligações fracas e interações entre enzima e substrato (Nelson & Cox, 2006). Diferente do que se acreditava previamente, o sítio ativo da enzima não é totalmente complementar ao substrato e sim ao estado intermediário da reação, portanto, fracas interações entre o complexo enzima+substrato são formadas gradativamente durante a catálise e liberam energia para que a reação total aconteça.

Com os avanços na biologia molecular, manipular a sequência genética para tornar as enzimas mais eficientes ou ainda inserir o gen de uma proteína de interesse em um micro-organismo que não o possua (expressão heteróloga) tornou-se mais acessível e por isso a utilização de enzimas em aplicações industriais aumentou consideravelmente.

## 2.2. Mercado de enzimas

Segundo o relatório da Business Communications Company Incorporated (2012) o mercado mundial de enzimas valia perto de 4,5 bilhões de dólares e, no ano seguinte, 4,8 bilhões. Já de acordo com o grupo Freedonia (2014), a taxa de crescimento anual esperada até 2017 é de 6,3 %. A Figura 1 mostra o crescimento projetado até 2022.

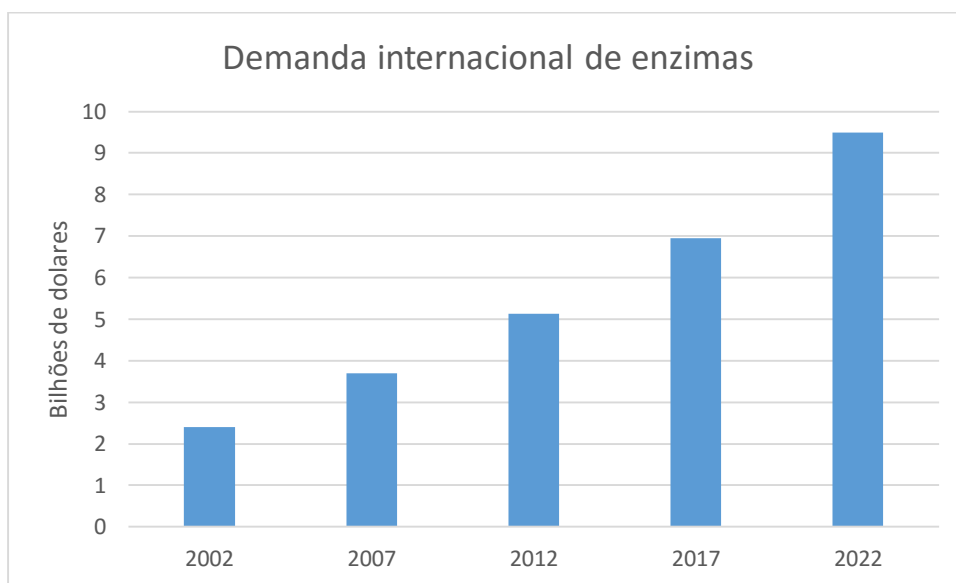


Figura 1: Mercado mundial de enzimas em 2002, 2007 e 2012 com projeções para 2017 e 2022. (Estudo industrial do grupo Freedonia, 2014)

Até o ano de 2012, 71% do mercado eram enzimas industriais, por exemplo, destinadas para a indústria alimentícia, de bebidas, detergentes e ração animal. No entanto, o empolgante crescimento previsto para os próximos anos será destinado ao grupo de enzimas ditas especiais, que abrangem as áreas de pesquisa, diagnóstico e biotecnologia. A Figura 2 apresenta como o mercado de enzimas estava distribuído em 2012 (Grupo Freedonia, 2014).

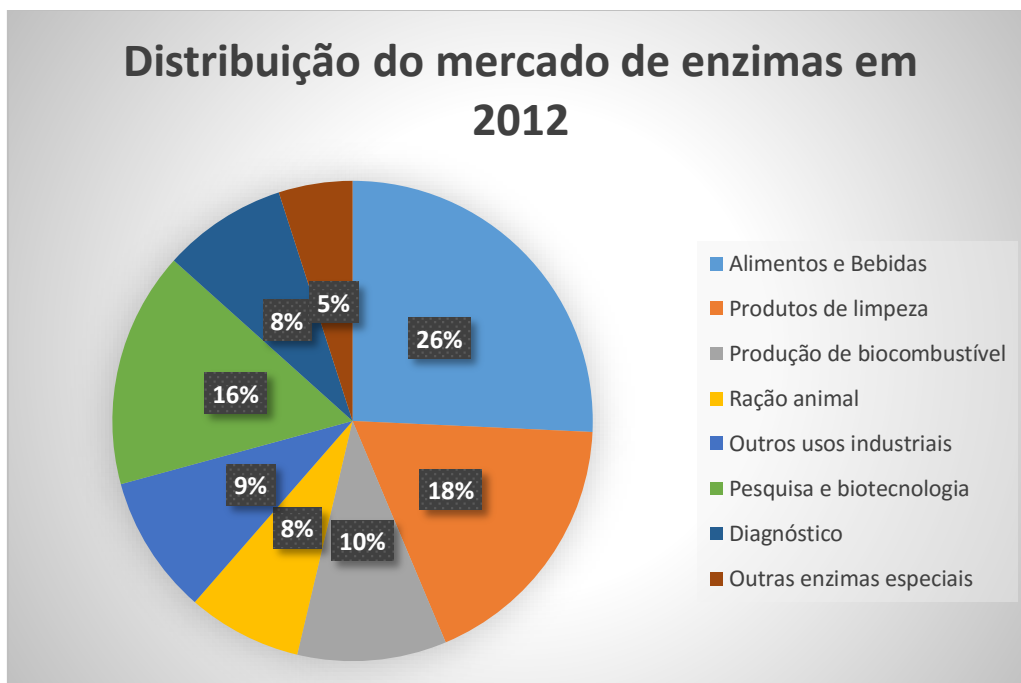


Figura 2: Mercado mundial de enzimas dividida por mercados, em 2012 (Estudo industrial do grupo Freedonia, 2014)

Neste mercado as empresas que comercializam enzimas de maior destaque no cenário mundial são: AB Enzymes; Advanced Enzyme Technologies Limited; Biocatalysts LTD.; Buckman Laboratories INC.; DuPont; DSM; Enzyme Solutions PTY. LTD.; Novozymes A/S e Specialty Enzymes & Biotechnologies CO (Bcc Research, 2014). Essas empresas representam juntas mais de 50% do mercado de enzimas.

Dentre os vários tipos de enzimas comercializadas, as que se destacam são as carboidrases, proteases, polimerases, nucleases, fitases e lipases. Esta última representa 5% do mercado atual e a projeção é que cresça 6,2% ao ano até 2017. Dentre as suas diversas utilização que serão discutidas a seguir, os ramos que prometem maior crescimento para esta classe de enzimas é o de alimentos e bebidas, produtos de limpeza e produção de biocombustíveis (Grupo Freedonia, 2014).



## 2.3. Lipase

As lipases (EC 3.1.1.3) são carboxil esterases que catalisam a hidrólise (e a síntese) de triacilgliceróis de cadeia longa, a diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres, como mostra a Figura 3. Além disso, são enzimas extremamente versáteis, que catalisam reações, como: hidrólise, transesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (Joseph *et al.*, 2008).

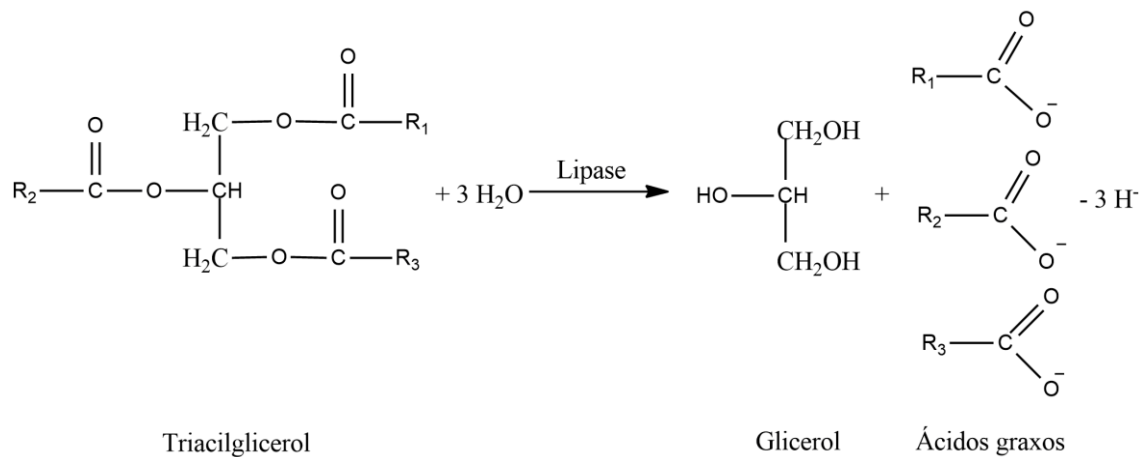


Figura 3: Reação de hidrólise catalisada por lipase

A Figura 4 mostra o mecanismo de atuação aceito para hidrólise feita por esta classe de enzimas, as etapas são:

- a) Ataque nucleofílico ao átomo de carbono suscetível da ligação éster do substrato pelo grupamento hidroxila da serina, ativado pela formação de uma ligação de hidrogênio com a histidina vizinha, abrindo a ligação C=O e dando origem ao intermediário tetraédrico. Nesta fase, a histidina da tríade tem um papel fundamental, aceitando, em seu anel imidazólico, o hidrogênio liberado pela serina. O aspartato ou o glutamato estabilizam a carga positiva que se formou na histidina.

- b) Estabilização do intermediário tetraédrico formado por ligações de hidrogênio com os grupamentos NH do esqueleto peptídico (cavidade do oxiânion). Doação de um próton da histidina, retorno da ligação C=O e conseqüente clivagem da ligação éster e liberação da porção álcool.
- c) Formação do intermediário covalente enzima “acilada”, onde o componente ácido do substrato encontra-se esterificado com o resíduo serina da enzima. A molécula de água que se aproxima e é ativada pelo resíduo histidina vizinho, e o íon hidroxila resultante promove o ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente.
- d) Ativação do caráter nucleofílico de uma molécula de água que se aproxima, acentuado pela ação básica da histidina protonada, e ataque nucleofílico ao carbono suscetível do intermediário acil enzima, abrindo a ligação C=O, formando um segundo intermediário tetraédrico.
- e) Retorno da ligação C=O, rompimento do segundo intermediário tetraédrico e liberação do ácido carboxílico e da enzima livre.

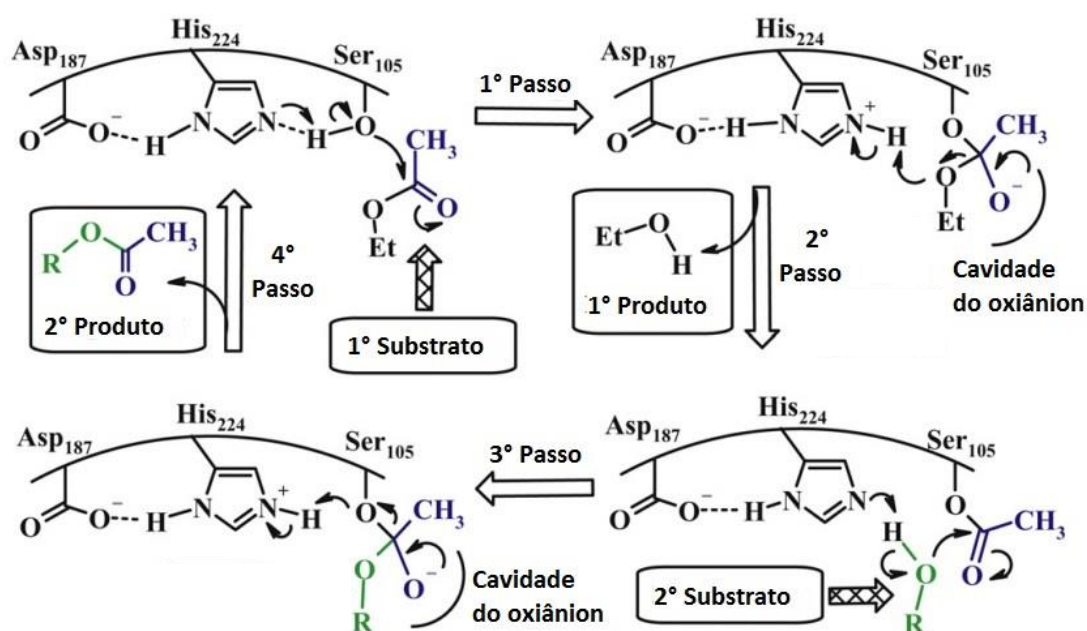


Figura 4: Mecanismo de transesterificação da reação catalisada por lipase. A tríade catalítica está numerada de acordo com a enzima Cal B de *Candida antarctica*. (Traduzido de Simas et al., 2011).

A lipase é capaz de transesterificar moléculas de ácidos graxos de elevada massa molar e sabendo-se que as várias matérias-primas agropecuárias são ricas em gorduras e óleos, o emprego delas como fonte de biocombustíveis ganha notável importância tecnológica, social e econômica (Lee *et al*, 2002).

Apesar de todas as vantagens destas enzimas ainda é necessário aumentar a produtividade dos processos produtivos por meio da utilização de micro-organismos que sejam melhores produtores, otimização das condições de cultivo (Hadeball *et al*, 1991) ou ainda modificação genética de micro-organismos que sirvam como plataforma de expressão (Jaeger; Eggert, 2002).

Embora lipases sejam produzidas também por eucariotos superiores (plantas e animais), as principais utilizadas são as de origem microbiana. As lipases de origem microbiana são muito apreciadas por suas características peculiares como atividade e estabilidade em solventes orgânicos e em condições extremas de pH e temperatura, seletividade pelo substrato, régio- e/ou enantiosseletividade. As propriedades destas enzimas variam de acordo com sua procedência e os micro-organismos que podem produzi-las são

arqueobactérias, bactérias, actinomicetos e fungos (Messias *et al.*, 2011). Dentre os fungos, alguns gêneros leveduriformes são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Saccharomycopsis sp.* e *Yarrowia sp.* (Almeida, 2009) e o reconhecimento como melhores produtores de lipases ficam com os fungos filamentosos (Cardenas *et al.* 2001).

No entanto, é preciso levar em conta que a escolha do micro-organismo é preponderante na escolha da forma de cultivo que será adotada. Para cultivo de fungos filamentosos a fermentação no estado sólido vem sendo bastante utilizada (Gutarra *et al.*, 2007) e, para leveduras, a fermentação submersa é, em geral, mais indicada (Brozzoli *et al.*, 2009). Ambas as formas de cultivo serão abordadas mais à frente.

## 2.4. Lipase B de *Candida antarctica*

A lipase B de *Candida Antarctica* (CalB) é um dos biocatalisadores mais amplamente utilizados em síntese orgânica, pois além de apresentar alta atividade e estabilidade em meios aquoso e não aquoso (Anderson *et al.*, 1998) possui especificidades variáveis frente a diversos substratos e é extremamente eficiente em síntese de ésteres.

A CalB é uma proteína globular, composta por 317 aminoácidos com massa molar de 33kDa (WO Patent 1988002775; 1986). Na Tabela 1 estão descritas algumas propriedades e características da CalB (Kirk; Christensen, 2002).

Tabela 1: Propriedades e características da CalB, adaptado de Kirk e Christensen, 2002.

	CalB
Massa Molar (KD)	33
Ponto isoelétrico	6,0
pH ótimo	7
Atividade específica (LU/mg)	435

Termoestabilidade a 70°C <sup>a</sup>	15 [0]
Estabilidade ao pH <sup>b</sup>	7 – 10
Régioespecificidade na hidrólise de TAG*	Sn-3

(a) Atividade residual após incubação a 70°C em pH 7 por 20 min [120 min].

(b) pH no qual houve retenção de pelo menos 75% da atividade após incubação por 20 min a temperatura ambiente. \* TAG (Triacilglicerol)

O primeiro a caracterizar estruturalmente a CalB foi Uppenberg e colaboradores em 1995. Como muitas lipases, ela apresenta o típico dobramento  $\alpha/\beta$  hidrolase, seu sítio ativo é composto pela tríade Ser-Asp-His, e consiste em uma bolsa de ligação acil de pequenas e grandes porções de bolsas secundárias de ligação álcool. Diferente da maioria das lipases, a entrada do sítio ativo da CalB não possui nenhum impedimento e não exibe ativação interfacial (Martinelle *et al*, 1995). Essa estrutura do seu sítio ativo garante a enzima excelente enancioseletividade (Gotor-Fernández, 2006). A Figura 5 apresenta a estrutura tridimensional desta lipase.



Figura 5: Estrutura tridimensional da Lipase B de *Candida antarctica*, enfatizando a tríade catalítica (em azul) e as estruturas secundárias alfa hélice e folha beta.

Alguns fatores precisam de uma atenção especial quando lipases são utilizadas em processos industriais tais como: custo e estabilidade. Assim, a técnica mais utilizada para minimizar estes inconvenientes é a imobilização, pois além de permitir uma redução de custos, visto que o biocatalisador pode ser reutilizado algumas vezes, permite também a separação dos produtos do meio reacional de forma relativamente fácil e, em alguns casos eficiência catalítica da enzima pode ser aumentada devido a um fenômeno conhecido como hiperativação enzimática (Wang e Hsieh, 2008; Manoel *et al*, 2013).

Apesar das inúmeras vantagens esta técnica representa, em alguns casos há perda de atividade enzimática, inibição enzimática e limitações difusionais. Há portanto necessidade de conhecer as propriedades do suporte, além da forma como este interage com a enzima de interesse de acordo com a metodologia de imobilização escolhida (Bryjak *et al*, 2008).

## 2.5. Aplicações das lipases

Devido a sua grande versatilidade, como mencionado anteriormente, diversos segmentos industriais utilizam lipases em seus produtos, tais como: adição em detergentes para utilização doméstica e industrial, devido a capacidade de catalisar a hidrólise de lipídeos (Sharma *et al*, 2001), na indústria de papel, para remover componentes hidrofóbicos como triglicerídeos e ceras da madeira (Jaeger; Eggert, 2002) , na obtenção de combustíveis alternativos como o biodiesel (Aguieiras *et al.*, 2014) , na indústria farmacêutica para diferenciação de enantiômeros (Manoel *et al*, 2013), dentre outras utilizações que estão resumidas na Tabela 2, abaixo.

*Tabela 2: Exemplos de aplicações industriais de lipases (Paques e Macedo, 2006; Hasan et al., 2006; Freire e Castilho, 2008; citado em Machado, 2011)*

---

<b>Área Industrial</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Produto</b>
------------------------	------------------	----------------

---

<b>Alimentação</b>	Hidrólise de gordura do leite Síntese de ésteres Transesterificação de óleos Melhorar textura Hidrólise de óleos e gorduras Remoção de manchas/gordura Síntese de ésteres	Agentes flavorizantes para produtos matinais Aromas para alimentos e bebidas Manteiga de cacau Fabricação de pães Ácidos graxos, di e monotriglicerídeos Detergentes Ésteres, emulsificantes
<b>Química</b>	Transesterificação de óleos vegetais Pré-tratamento enzimático de efluentes oriundos de abatedouros e indústria de laticínios.	Biodiesel Resíduos contendo menos gorduras
<b>Médica</b>	Dosagem de triglicérides do sangue Resolução enantiosseletiva	Kits diagnósticos (R,S)-ibuprofeno, (R,S)-naproxeno
<b>Cosméticos</b>	Síntese de ésteres	Fragrância para perfumes

Além das aplicações industriais, conforme a Tabela 2, diversos grupos de pesquisa vem estudando a otimização da produção de Lipase B de *Candida Antarctica*, visando novos usos. Dentro deste contexto, podemos destacar:

Jin e colaboradores (2012) investigaram a produção de ésteres flavorizantes utilizando um sistema onde toda a célula produtora de lipase B de *Candida antarctica* foi utilizada como biocatalisador. O biocatalisador mostrou grande tolerância a altas concentrações de substrato, além de possibilitar a produção de 10 ésteres flavorizantes com conversões acima de 95% após 4h de reação. Após 10 reutilizações o biocatalisador não apresentou perda significativa de atividade.

Idris e Bukhari (2012) investigaram a síntese do ácido polilático (PLA) combinando diferentes técnicas de imobilização e o uso de líquidos iônicos utilizando a lipase B de *Candida antarctica*. Os autores obtiveram 63% de rendimento quando a conversão foi feita a 90°C em líquido iônico.

Kim e colaboradores (2013) utilizaram com sucesso a lipase de *Staphylococcus haemolyticus* L62, como biocatalisador na produção de biodiesel. Conversões em torno de 89,4% foram obtidas após 96h de reação a 30°C.

Taher e colaboradores (2014) utilizaram a enzima Novozym®435 para catalisar a produção de biodiesel em fluido supercrítico CO<sub>2</sub>. A transesterificação apresentou conversão máxima de 80% após 4h de reação (47°C, 200bar).

Mangas-Sánchez e colaboradores (2015) sintetizaram, com 76% de conversão, a 2-monoleína utilizando a lipase de *Rhizopus oryzae* com composição de isômeros de 99:1. Os autores também sintetizaram a 1,2-Dioleína com a lipase de *Pseudomonas fluorescens* que atingiu 58% de conversão com composição de isômeros de 93:7. Estes compostos são usados como emulsificantes e surfactantes na indústria de alimentos, e possuem ação antimicrobiana e antioxidante.

Roby e colaboradores (2015) produziram um éster fenólico de ácido docosahexaenoico (DHA), utilizando a lipase B de *Candida antarctica*. O éster produzido se mostrou capaz de mimetizar os efeitos benéficos de duas biomoléculas naturais e, por isso, foi considerado como um promissor ingrediente funcional na indústria de alimentos.

## **2.6. A levedura *Pichia pastoris***

O avanço da manipulação genética ao longo das últimas décadas possibilitou o uso de micro-organismos recombinantes para produção de diversas proteínas. Assim, muitos estudos têm sido efetuados com o objetivo de encontrar modos de produção eficientes de proteínas em sua forma funcional (ativa), o que está intimamente ligado à maquinaria celular do organismo que a produz (Macauley-Patrick et al., 2005).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é considerada uma plataforma de expressão eucariótica para proteínas com melhor custo/benefício entre os pesquisadores, tanto em escala laboratorial quanto industrial.



Quando comparada com células animais, *P.pastoris* não requer um meio de cultivo ou condições de cultura complexos, é geneticamente fácil de manipular, pode atingir altos níveis de expressão proteica (intra e extracelular), além de ser capaz de fazer modificações pós-traducionais como: glicosilação, formação de pontes de dissulfeto e proteólise (Cregg et al., 2000). Ela pode crescer até altas densidade celulares (Wegner, 1990), prefere o metabolismo aeróbio ao anaeróbio e a purificação da proteína secretada é facilitada, já que a variedade de proteínas secretadas naturalmente é pequena (Cregg et al, 1993).

## **2.7. Tipos de promotores para proteínas recombinantes**

### **2.7.1. Produção não associada ao crescimento**

O cultivo em sistemas não-associados possui duas fases de crescimento, a primeira sendo uma batelada comum e a segunda uma alimentação com o indutor da produção que, no caso da *P. pastoris*, é o metanol. A produção da proteína alvo não associada ao crescimento celular é interessante quando não ocorre inibição pelo produto ou este pode ser retirado continuamente do meio de cultivo.

Os promotores mais usados na constituição do vetor de proteínas recombinantes para este tipo de produção em *P. pastoris* são o pAOX1 e pAOX2 (referente as enzimas álcool oxidase I e II), porém o primeiro se destaca e é o responsável pelo sucesso desta levedura como sistema de expressão heteróloga. Ele foi isolado e utilizado primeiramente para o desenvolvimento de vetores e protocolos de manipulação genética pelo Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc. (SIBIA) (Macauley-Patrick et al., 2005).

O primeiro passo reacional para produzir uma dada proteína em *P. pastoris* neste sistema é a expressão do AOX1 nos peroxissomos, ela depende do fluxo de metanol e oxigênio na presença do cofator, FAD, e gera formaldeído e peróxido de hidrogênio como produtos. O formaldeído é metabolizado por vias de desassimilação e assimilação. Já a espécie reativa ( $H_2O_2$ ) induz um *stress* oxidativo que é associado com a condição fisiológica da *P. pastoris* durante a

fase de indução (Xiao *et al*, 2006; Kim *et al.*, 2013). A Figura 6 apresenta o mecanismo de assimilação do metanol pela levedura.

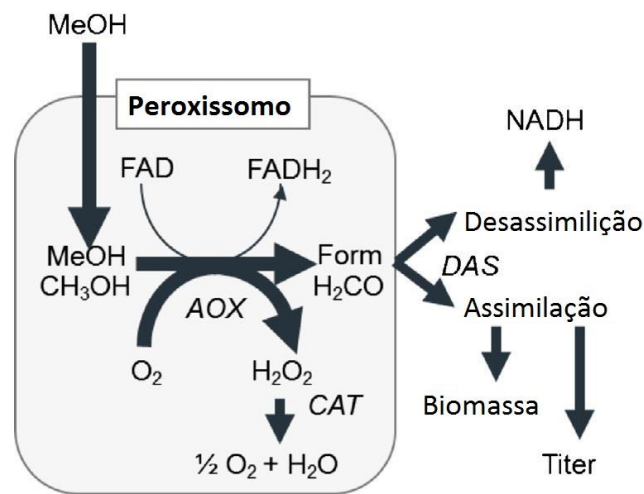


Figura 6: Proposta de fluxo metabólico do metanol durante a etapa de indução em cultura de *Pichia pastoris*. (Kim *et al*, 2013)

Apesar de ser um sistema efetivo e muito utilizado, o metanol pode representar perigo de explosão e à saúde do trabalhador visto que, em escala industrial, grandes quantidades precisariam ser estocadas na própria planta. Além disso a alimentação precisa ser bem controlada a fim de manter a viabilidade celular. As desvantagens supracitadas geram entraves tecnológicos na evolução de processos que utilizam um promotor de indução por metanol.

### 2.7.2. Produção associada ao crescimento

Como alternativa para contornar os inconvenientes trazidos pela utilização do metanol, promotores de expressão constitutiva vem sendo explorados. Neste sistema de expressão o crescimento e a produção acontecem em paralelo, ou seja, em apenas uma etapa de fermentação.

O promotor pGAP, primeiramente isolado por Waterham em 1997, é o mais utilizado sendo considerado um promotor forte, uma vez que está associado a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que participa da via glicolítica, que é bem regulada (Zhang *et al.*, 2009). O que foi utilizado no presente estudo é o

promotor referente a enzima fosfoglicerato kinase I (PGK) que, assim como o GAP, também é regulado pela mesma via.

Apesar do pGAP ser o mais estudado, existem outros promotores constitutivos sendo investigados como: pPICZA<sub>gfp</sub>, pGH<sub>g</sub>, pSAOH5, pDS56, pPGK1, dentre outros (Qin et al., 2011; Stadlmayr et al., 2010).

Na Figura 7 estão ilustradas as vias metabólicas que envolvem ambos os promotores citados. O GAP participa da quinta etapa da via glicolítica e o PGK da sexta e portanto geram produções comparativas dependendo da fonte de carbono fornecida a célula.

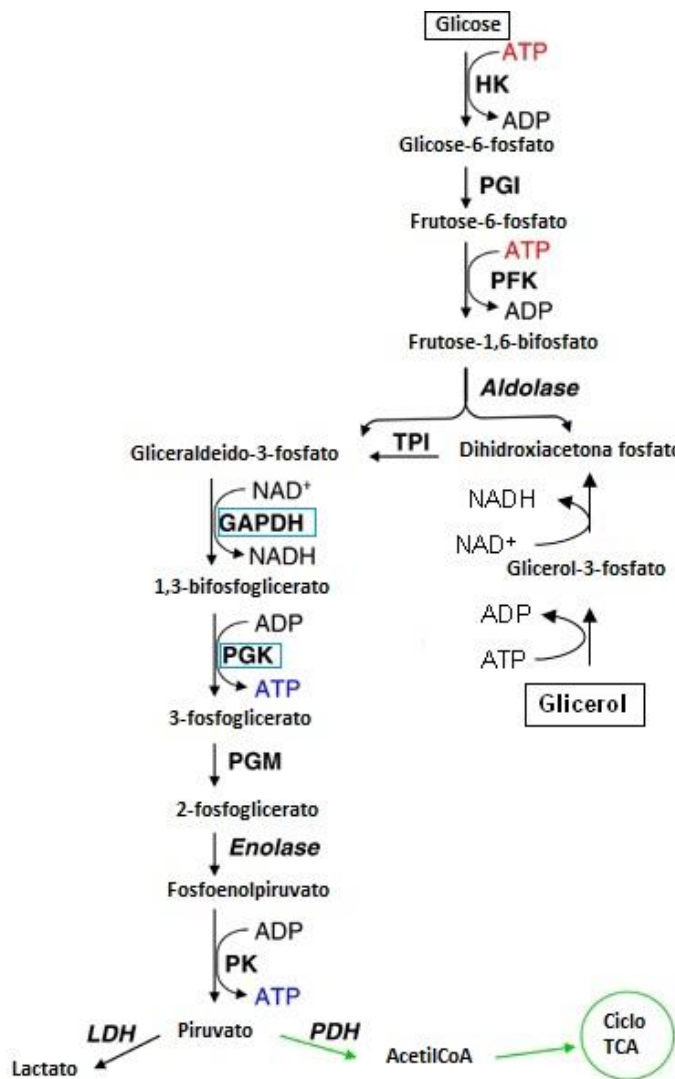


Figura 7: Via glicolítica, em destaque nos quadrados pretos onde glicose e glicerol começam a ser metabolizados, em destaque os quadrados azuis a localização dos dois promotores constitutivos citados (GAP e PGK) (modificado de Pelicano et al, 2006)

### 2.7.3. Aplicações dos promotores de *Pichia pastoris*

Apesar de possuir promotores que possibilitam dois modos de produção bem distintos, quando comparada com outras espécies de leveduras (por exemplo, *Saccharomyces sp*), o número de promotores passíveis de utilização é pequeno e limitado quando se tratando de promotores com forte regulação (Stadlmayr et al., 2010). A seguir, estão descritos alguns estudos recentes que avaliaram a produção de diferentes proteínas alvo, utilizando os promotores já consagrados e alguns alternativos na levedura *P. pastoris*.

Stadlmayr e colaboradores (2010) testaram 24 promotores alternativos, tal como o PGK, para *P.pastoris* além dos já bem utilizados AOX1 e GAP. O trabalho apresentou a correlação entre atividade do promotor e taxa específica de crescimento na expressão soro albumina humana. Foram detectados alta correlação e altos níveis transcricionais com os promotores p GAP, pTEF1 e pTHI11, sendo o último o primeiro promotor regulado que pode ser controlado independentemente dos principais componentes nutricionais (carbono e nitrogênio).

Qin e colaboradores (2011) elaboraram uma biblioteca de promotores para *P.pastoris* baseada na mutagênese do promotor constitutivo GAP. Foram selecionados 33 mutantes que mostraram uma atividade de 0,6 a 19,6 vezes maior em relação ao promotor selvagem.

Wang e colaboradores (2012) avaliaram a produção da lipase de *Yarrowia lipolytica* em *Pichia pastoris* usando o promotor GAP. Em biorreator de 10L foi possível alcançar por meio de batelada alimentada 120g/L de biomassa e 13.500 U/ml de atividade lipolítica.

Garcia-Ortega e colaboradores (2013) avaliaram a produção em batelada alimentada de fragmento de um ligante de antígeno humano (Fab) recombinante, usando o promotor constitutivo GAP em *Pichia pastoris*. O efeito da taxa

específica de crescimento na produção foi estudado e os melhores resultados foram com  $\mu = 0,15h^{-1}$ .

Kim e colaboradores (2013) investigaram como o AOX1 e peroxissomos são regulados de acordo com a disponibilidade da fonte de carbono. Verificaram que a atividade do AOX1 começou a cair depois de 34h, o que sugere que a disponibilidade de metanol é limitada pelo crescimento de biomassa e vazão de alimentação. O processo limitado por oxigênio foi efetivo e teve uma mínima lise celular na produção de anticorpos.

Noseda e colaboradores (2014) otimizaram a produção e purificação da quimosina bovina recombinante atrelada a um promotor AOX1 utilizando uma cepa de *P.pastoris*, onde a maior produção foi obtida com uma taxa específica de crescimento de  $0,01 h^{-1}$  durante a fase de indução. Utilizando a cromatografia de gel filtração os autores obtiveram 95% de pureza do produto com 6400 IMCU/mg.

Como fica evidente nos estudos acima e na literatura em geral, para maximizar a produtividade volumétrica de proteínas recombinante, é ideal que a *P.pastoris*, seja cultivada em alta densidade celular. Desta forma, além de ser influenciada pela construção e número de cópias do gen, a produtividade de uma proteína também varia de acordo com o meio de cultivo, métodos de cultivo e parâmetros do processo (Zhu et al, 2011).

Assim, a fim de alcançar elevadas produtividades, os processos fermentativos precisam ser compreendidos e estudados para que uma estratégia adequada possa ser traçada.

## **2.8. Processos fermentativos**

Independente da origem escolhida, as enzimas microbianas são produzidas principalmente por dois tipos de processos fermentativos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação no estado sólido (FES).

Como dito anteriormente, certos micro-organismos se adaptam melhor a determinado tipo de processo, como por exemplo, os fungos filamentosos, em

geral, são melhores adaptados a FES. No entanto, deve-se considerar que, as principais diferenças entre a FES e FS é que a primeira ocorre com a quantidade de água mínima para o desenvolvimento microbiano, enquanto que na FS os nutrientes, estão dissolvidos em água, e são utilizados principalmente leveduras, bactérias e algas (Fernandes, 2007).

Por definição, a FS é aquela na qual o micro-organismo produtor se desenvolve no interior do meio de cultivo, geralmente agitado. Majoritariamente, a produção de enzimas em escala industrial é realizada por processo submerso devido às suas vantagens em relação a FES (Lima et al, 2001; Pereira, 2007):

- Relativa facilidade de cultivo e no controle de grandes volumes;
- Os micro-organismos são submetidos as mesmas condições físicoquímicas, devido a homogeneidade do meio, o que facilita o acesso aos nutrientes;
- Parâmetros de controle de processo podem ser facilmente controlados (pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato);

Entretanto, devido à alta atividade de água e dependendo da composição do meio de cultivo, há maior facilidade de contaminação pois a FS pode proporcionar um ambiente ideal para desenvolvimento de diversos micro-organismos.

## **2.9. Modos de condução de processos fermentativos**

### **2.9.1. Batelada**

Por sua simplicidade operacional, processos conduzidos em batelada fornecem o conhecimento básico sobre a cinética de crescimento do micro-organismo, consumo de substrato e geração de produto. Geralmente é usado como base

para comparação com eficiências atingidas em processos mais complexos (Schmidell et al, 2001).

Em uma batelada o volume é constante e somente é adicionado oxigênio (caso o processo seja aeróbio), além de ácido e base a fim de controlar o pH. Por ser um sistema fechado, ele é menos propício a contaminações e é altamente indicado para quando a assepsia é um fator indispensável.

Para a indústria este não é o tipo mais comum de processo adotado pois os rendimentos são baixos e o fato dos nutrientes se extinguirem e metabólitos secundários se acumularem limitam a obtenção do produto de interesse (Çalık et al., 2015). Além disso, o tempo morto que é necessário para a limpeza, esterilização e recomeço da fermentação é uma desvantagem para produção industrial (Schmidell et al, 2001).

#### 2.9.2. Batelada alimentada

Diferente de uma batelada convencional, neste caso há inclusão de nutrientes e, portanto, o volume é variável e não há retirada de produto ou células. Normalmente, este tipo de processo fermentativo é indicado para diversos produtos biotecnológicos, já que, com a alimentação ajustada de nutrientes, é possível alcançar a alta densidade celular e ainda impedir o efeito de repressão por substrato (Schmidell et al, 2001; Çalık et al., 2015).

Há vários modos como a alimentação do substrato pode ser conduzida, a saber: alimentação constante, exponencial, por pulso e por feedback.

As alimentações constante e exponencial inserem continuamente no meio de cultivo os nutrientes selecionados depois da primeira fase de batelada. No caso de alimentação constante é mantida a mesma taxa de alimentação durante todo o processo, Goodrick e colaboradores (2001) utilizaram essa estratégia para produção da enzima quitinase com sucesso. Já a alimentação exponencial é feita com o objetivo de controlar a taxa específica de crescimento. Para calcular a quantidade de substrato necessária para que a célula mantenha a taxa desejada é utilizada uma equação (Equação 1) derivada do balanço de massa construído para célula e substrato (Çalık et al., 2015).

$$Q(t) = \frac{\mu_0 C_x V_0}{C_{s0} Y_{x/s}} \exp(\mu_0 t) \quad \text{Eq 1}$$

Onde Q é a vazão volumétrica (L/min),  $\mu_0$  é a taxa específica de crescimento ( $\text{min}^{-1}$ ) pré-determinada,  $V_0$  é o volume inicial da fermentação (L),  $C_x$  é a concentração de células (g de célula/L),  $C_{s0}$  é a concentração do substrato na alimentação (g de substrato/L) e  $Y_{x/s}$  é o rendimento de célula por substrato (g de célula/g de substrato).

As alimentações por pulso e por feedback, diferente das outras apresentadas, são baseadas em um ou mais parâmetros do progresso da reação. A diferença entre elas é que a por pulso depende do monitoramento do operador e a quantidade de pulsos é pré-determinada. Kottmeier e colaboradores (2012) realizaram a alimentação por pulsos na produção de hidrofobinas classe 2 (HFB1) de *Trichoderma reesei* em *Pichia pastoris*. Foram feitos dois pulsos de 11 e 85 mL de uma solução 0,5 g/mL de glicose depois de 9 e 13h de cultivo, respectivamente, em reator com volume útil de 550mL.

No caso da alimentação por feedback esta depende do controle automatizado de variáveis indiretas (concentração de fonte de carbono, DO e concentração de etanol). Zhao e colaboradores (2008) iniciaram uma alimentação exponencial ao final da batelada que foi disparada pelo aumento da oxigênio dissolvido (OD) acima de 50%. A alimentação foi regida por uma equação que relaciona taxa específica de crescimento, volume inicial do reator e concentração inicial de células e a concentração de glicose foi controlada para não ultrapassar 40 g/L. Já no caso estudado por Baumann e colaboradores (2008), a alimentação foi contínua e iniciada após uma batelada de 24h. A taxa de diluição foi de  $D=0.1 \text{ h}^{-1}$  ajustando a vazão mássica para 100g/h.

### 2.9.3. Contínuo

Quando um processo é conduzido de forma contínua a alimentação de nutriente e remoção de produto ocorre a uma vazão constante com o objetivo de controlar



o crescimento e atingir uma produtividade ótima (Schmidell et al, 2001). Além disso é possível manter a célula produzindo por um tempo maior que nos outros processos supracitados. Para se ter esse controle é importante que não haja arraste das células (wash-out), essa condição crítica é determinada pela taxa de diluição que é calculada pela Equação 2.

$$D = \frac{F}{V} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde D é a taxa de diluição ( $\text{h}^{-1}$ ), F é a vazão de saída do reator ( $\text{m}^3/\text{h}$ ) e V é o volume do reator ( $\text{m}^3$ ). Essa taxa precisa ser ajustada a fim de que, num primeiro momento, a biomassa cresça e posteriormente a taxa específica de crescimento seja mantida.

Na indústria química este é um modo de condução muito utilizado, no entanto, para os bioprocessos existem algumas desvantagens, a saber: maior possibilidade de contaminação, pois é um sistema aberto; não pode ser implementada para organismos filamentosos; não é possível produzir compostos que não estão associados ao crescimento celular; e a possibilidade de ocorrerem mutações prejudiciais e perda plasmidial em microrganismos recombinantes é muito grande (Schmidell et al, 2001).

O processo contínuo a primeira vista se mostra muito tentador, mas, a dificuldade de sua implementação e as restrições do processo torna-o pouco indicado para produção de proteínas recombinantes em hospedeiros heterólogos.

## **2.10. Parâmetros que influenciam o processo e podem ser controlados**

### **2.10.1. Composição do meio**

Na composição do meio de cultivo para o crescimento celular, dois componentes principais precisam ser levados em consideração: Fonte de carbono e de

nitrogênio. A relação entre ambos é conhecida como relação C/N e impacta diretamente no crescimento pois, a escassez de um ou outro afeta diretamente o crescimento celular.

No caso de leveduras, como a *P. pastoris*, a principal fonte de carbono utilizada é a glicerol, no entanto, ácido oleico e glicose podem ser fontes alternativas.

A escolha da fonte de carbono inadequada pode além de inibir o crescimento, também desviar o metabolismo do micro-organismo. O uso de glicose, por exemplo, como fonte de carbono, em sistemas onde a indução com metanol é necessária reprime a expressão de proteínas heterólogas (Minjie; Zhongping, 2013). Apesar de entrarem no metabolismo de carbono frutose, sorbitol, manitol e trealose não são substratos usuais em cultivos microbianos (Çalık et al., 2015).

Além do carbono, o nitrogênio também é importante para o crescimento celular, sendo assim, Choi e Park (2006) investigaram os efeitos de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas para crescimento de *P. pastoris* e expressão de alfa-amilase de roedor. O nitrogênio orgânico proporcionou melhores resultados, porém o estudo não excluiu a possibilidade de uso do nitrogênio inorgânico, uma vez que o custo de obtenção deste é muito inferior aos de fontes orgânicas.

Além de levar em consideração os principais componentes do meio (fonte de Carbono e Nitrogênio), a decisão entre usar meios definidos e não definidos recai principalmente sobre o custo. Chauhan e colaboradores (1999) utilizaram meio definido com 5% de glicerol como fontes de C e o uso de meio com composição basal aumentou o crescimento celular em 44,4% e uma quantidade limitada de casamino ácidos foi adicionada durante a fase de indução com metanol, dobrando os níveis de expressão de um antígeno da superfície do vírus de Hepatite B(HBsAg).

#### 2.10.2. Temperatura

Em geral, a temperatura de crescimento padrão é bem estabelecida para cada espécie de micro-organismo e deve ser mantida durante todo o processo fermentativos e, caso não haja referência anteriores na literatura, ensaios experimentais devem ser conduzidos para defini-la. Recentemente, alguns

pesquisadores como Jahic e colaboradores (2003) e Dragosits e colaboradores (2009), mostraram que a diminuição de temperatura (10 °C) durante a fase de produção foi benéfico para que a expressão de proteínas heteróloga devido ao melhor enovelamento da proteína e conseqüentemente obtenção de maiores atividades enzimáticas.

### 2.10.3. pH

O pH tem papel muito importante no crescimento e produção, principalmente quando a produção da proteína heteróloga é extracelular, uma vez que a taxa específica de crescimento do hospedeiro e a funcionalidade da proteína são parâmetros afetados diretamente por esta variável (Minjie; Zhongping, 2013).

No caso da levedura *P. pastoris* o pH ótimo de crescimento se situa em torno de 3,5 a 5,5 (Inan et al, 1999), contudo isto não exclui a possibilidade de se trabalhar com pHs mais altos. A escolha deste parâmetro é função da produtividade da proteína alvo. Por exemplo, Choi e Park (2006) obtiveram melhor atividade da  $\alpha$ -amilase de rato controlando o pH em 6,0 com variação na faixa 5 a 7 no cultivo de *Pichia pastoris*.

### 2.10.4. Concentração de oxigênio dissolvido

Outro parâmetro importante e que não pode ser negligenciado em processos aeróbicos é a concentração de oxigênio dissolvido (OD). Para assegurar uma alta disponibilidade de oxigênio, o coeficiente de transferência de massa precisa ser maximizado por meio do ajuste dos seguintes parâmetros: diâmetro e quantidade de saídas de ar, geometria e posicionamento dos impelidores dentro do reator, agitação e concentração de oxigênio no gás de aeração (Minjie; Zhongping, 2013).

Em geral, para a produção de proteína heteróloga em *P. pastoris*, o ideal é que a OD seja mantida em torno de 10 a 30% da saturação (Çelik e Çalık, 2012). O metabolismo desta levedura é conhecido como um processo altamente consumidor de oxigênio. O sucesso da fermentação está intimamente ligado a taxa de consumo de oxigênio, parâmetro conhecido como OUR (taxa de consumo de oxigênio) (Jahic et al., 2002) porém, manter uma OD maior que a

recomendada pode acarretar problemas de estresse oxidativo, já que a fluidez e permeabilidade da membrana celular podem aumentar (Baumann et al., 2010).

### **2.11. Aumento de escala da produção**

O objetivo de qualquer processo de otimização, para produção de uma biomolécula, em geral, visa à produção industrial de forma a atender uma determinada demanda estipulada e maximizar o lucro. Um estudo muito promissor foi conduzido por Zhao e colaboradores (2008) para a produção de uma lipase estável de *Candida rugosa* em *Pichia pastoris* utilizando promotor GAP. Inicialmente em uma escala de 5L e batelada simples os autores chegaram a 74 g/L de peso seco e 670 U/ml de atividade. Após diversas otimizações quando a produção foi levada a escala de 800L, utilizando batelada alimentada, a produção atingiu 14.000 U/ml de atividade lipásica e uma concentração celular de 500g/L de peso úmido, demonstrando grande potencial para comercialização desta enzima.

A maior causa de falhas nos processos de aumento de escala ocorrem devido à falta de estudos técnicos adequados e organização do processo de aumento de escala (Merrow, 2011; Lager, 2012). As seguintes características do processo devem ser levadas em consideração neste processo (Harmsen, 2013):

- Reatividade química, incluindo corrosão, que pode variar de um fator de  $1-10^9$  por pequenas mudanças como quantidade de água ou ácido nas correntes.
- O número de parâmetros do processo pode facilmente exceder  $10^3$  e o efeito combinado destes parâmetros é não-linear
- A dinâmica do processo pode levar longo períodos para estabilizar, particularmente quando envolve reciclos.

- O comportamento hidrodinâmico quase sempre sofre alteração com o aumento de escala.

A soma dos fatores acima não pode ser, ainda, predita por modelos, e por isso, escalonar um processo sem estudos experimentais prévios não é adequado. Alguns estudos apresentam simulações em escala industrial, como feito por Goldrick e colaboradores (2015) para produção de penicilina e por Yu (2008) para produção de drogas genéricas, entretanto trata-se de uma área que ainda precisa ser mais explorada.

## **2.12. Glicerina bruta**

Um modo de diminuir o custo do meio de cultivo é incluir resíduos no mesmo e, com a produção de biocombustíveis líquidos em larga escala sendo uma tendência mundial, a oferta de glicerina tem se situado em nível superior à demanda. Isto se deve ao fato de que a glicerina é um coproduto inevitável da produção de biodiesel, que aumentou para mais de 2 milhões de toneladas por ano, em pouco mais de uma década (Gazzoni, 2011).

A glicerina bruta pode ser dividida em duas classes principais: a glicerina bruta hidrolisada, que é derivada da hidrólise dos triglicérides e contém traços de sais inorgânicos; e a glicerina bruta salgada, obtida residualmente da indústria de sabões e da indústria de biodiesel. Ambas podem ser refinadas para grau alimentício ou farmacêutico. A glicerina bruta, proveniente da produção de biocombustíveis, é especialmente interessante como matéria-prima para os produtores da Europa, uma vez que é creditada como emissão zero de dióxido de carbono, até o processo de coleta, segundo a Agência internacional de energia (IEA) (2010).

### **2.12.1. Obtenção**

O Biodiesel é um combustível líquido, biodegradável, não tóxico, produzido a partir de diferentes matérias-primas, tais como óleos vegetais diversos (mamona, dendê, soja, girassol, amendoim, algodão, etc.), gorduras animais, óleos e gorduras residuais, por meio de diferentes processos. A evolução

tecnológica evidencia a adoção da transesterificação como principal processo de produção, ela consiste numa reação química em meio alcalino, onde se fazem reagir óleos vegetais (ou gorduras animais) e um álcool (Macedo, 2005).

Essa reação tem como produto preponderante o biodiesel e como subproduto, tem-se a glicerina. A Figura 8 mostra a rota tecnológica de transesterificação metílica em que se utiliza o metanol como agente de transesterificação, obtendo-se como produtos os ésteres metílicos e o glicerol. R1, R2 e R3 são cadeias longas de hidrocarbonetos (Gerpen et al, 2004).

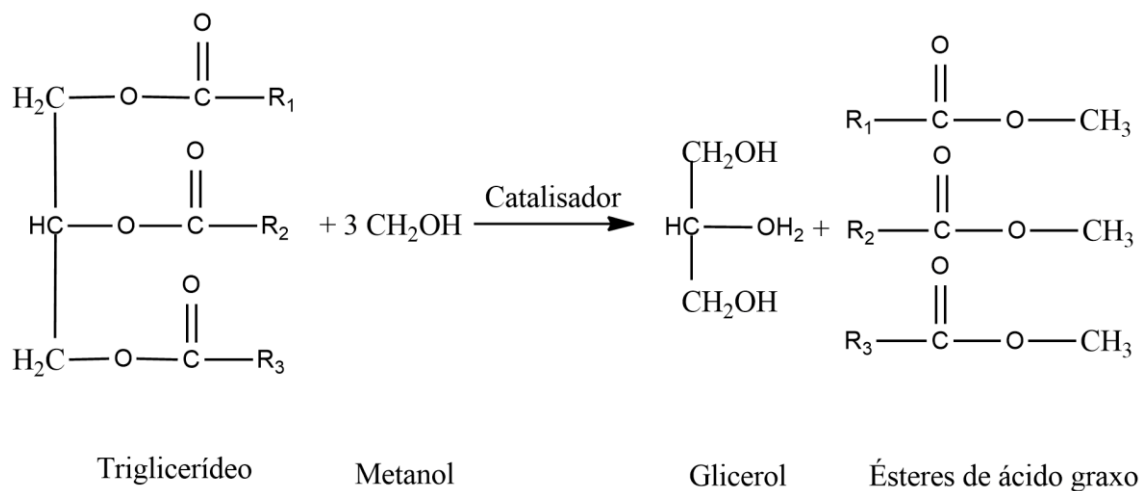


Figura 8: Reação de transesterificação metílica para produção de biodiesel (GERPEN et al, 2004)

Para Parente (2003), o processo de produção de biodiesel, partindo de uma matéria-prima, envolve 6 etapas operacionais, são elas: preparação da matéria prima; reação de transesterificação; separação de fases; recuperação e desidratação do álcool; destilação da glicerina (sendo esta etapa opcional) e purificação do biodiesel. A Figura 9 mostra o fluxograma do processo de produção do biodiesel.

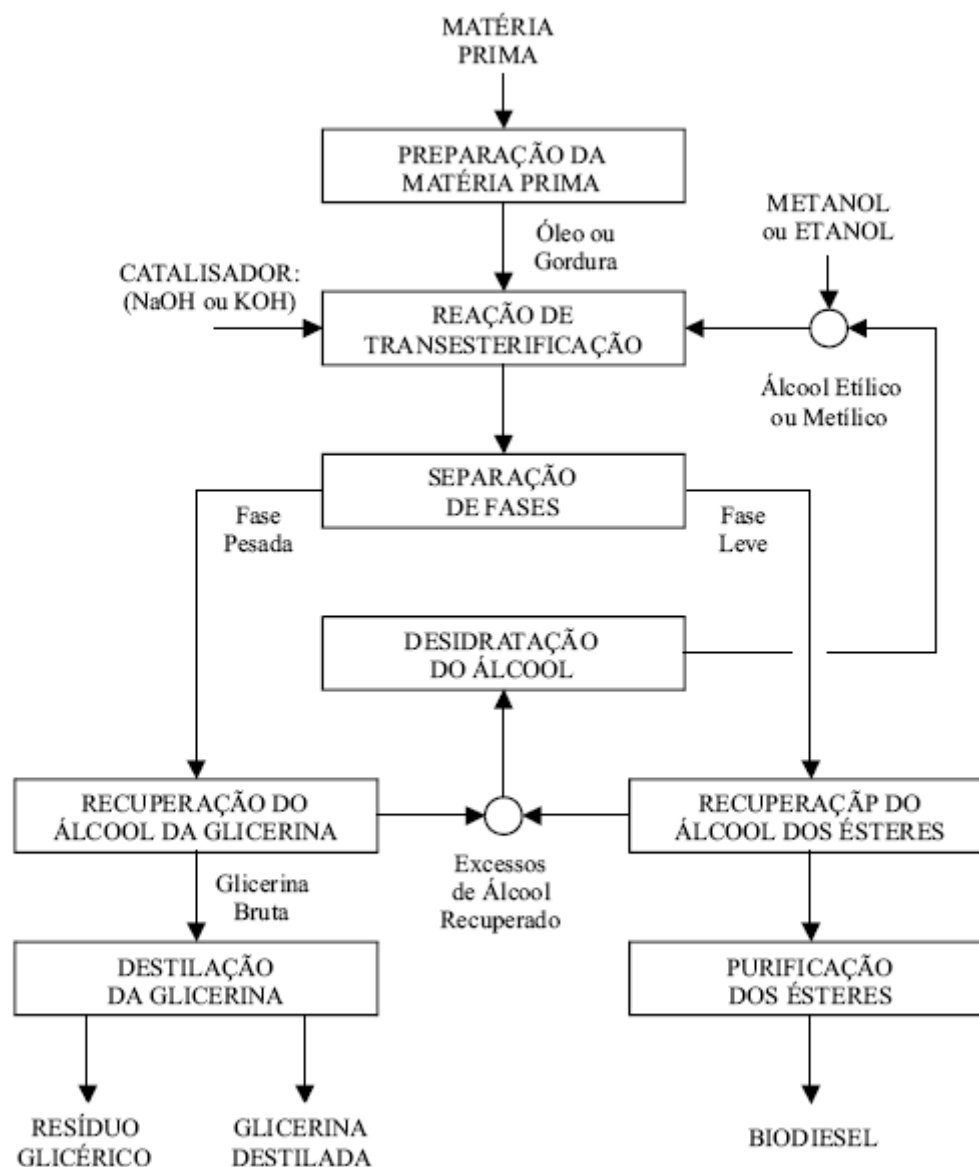


Figura 9: Fluxograma do processo de produção de biodiesel (PARENTE, 2003)

A reação é catalisada por um ácido ou uma base, na maioria das vezes utiliza-se o KOH (hidróxido de potássio) ou NaOH (hidróxido de sódio). Nessa reação as moléculas principais dos óleos e gorduras, os chamados triacilgliceróis, são separados em ácidos graxos e glicerol. A molécula de glicerol possui três grupos hidroxílicos (OH-) hidrofílicos que são responsáveis por sua solubilidade em água. Seu ponto de fusão é 17,8 °C e evapora com decomposição a 290 °C sendo miscível com água e etanol (Larsen, 2009). A geração deste composto, numa produção mássica, é de 10:1 de biodiesel:glicerina (Robra, 2006).

Existem quatro tipos de glicerina que podem ser obtidas: a bruta (contém resíduos do processo de fabricação do biodiesel, como catalisador, álcool, água, ácido graxos e sabões); a loira (possuindo entre 75 e 85% de glicerol, após a bruta receber tratamento ácido, seguido de remoção dos ácidos graxos); a de grau farmacêutico (a loira após ser bidestilada a vácuo e tratada com absorventes, apresentando mais de 99% de pureza); e a de grau alimentício (completamente isenta de etanol podendo ser obtida pela hidrólise de óleos e gorduras) (Biodieselbr, 2008).

Visto isso, para atender às exigências das indústrias farmacêutica e alimentícia, a glicerina bruta proveniente da fabricação do biodiesel precisa atingir um elevado grau de pureza e este só pode ser alcançado por meio de processos complexos e dispendiosos como a destilação e, especialmente no caso da glicerina oriunda da transesterificação de óleos e gorduras residuais da cadeia alimentar (OGR), o processo é tecnicamente complexo e economicamente inviável e é dominada por apenas algumas empresas brasileiras (Robra, 2006). Segundo Larsen (2009), os custos de implantação de uma fábrica para purificação da glicerina bruta são maiores que os necessários para instalação da própria planta de produção do biodiesel. Então fica claro a necessidade de se explorar novas utilizações para agregar valor à glicerina bruta.

#### 2.12.2. Mercado

Sendo a maior parte da glicerina comercializada como um coproduto, a oferta da glicerina é determinada então pela demanda do produto principal. O Brasil, ao produzir biodiesel para adição de 5% no óleo diesel (aproximadamente 2,6 milhões de toneladas do biocombustível por ano, Lei nº 11097), gera em média quase 300 mil toneladas de glicerina por ano. No entanto, esta quantidade não é totalmente absorvida e o excedente de glicerina vem saturando o mercado, sendo sua oferta maior que a procura, levando assim à queda do preço desse coproduto e a estocagem do mesmo sem um destino certo (Santos, 2011).

Segundo a Agência Nacional de Petróleo (ANP) a produção de glicerina aumentou de 2012 para 2013 em 5,7% e a tendência é de crescimento para os



próximos anos. Na Figura 10 está representado o cenário do mercado da produção de glicerina no Brasil.

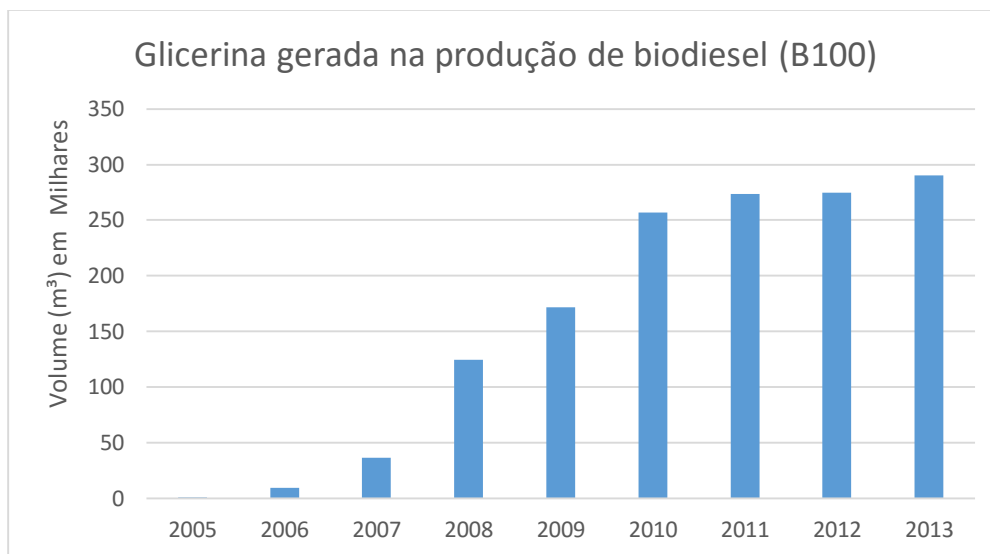


Figura 10: Produção de glicerina bruta segundo o biodiesel de 2005 a 2013 (ANP/SPD conforme resolução ANP n° 17/2004)

O crescimento observado dá margem ao declínio do preço da glicerina bruta que, no Brasil, em 2010, variou de 200 a 400 R\$/toneladas. Em 2011 este valor caiu para aproximadamente 150 R\$/tonelada (Quispe et al., 2013). Por outro lado, o valor do glicerol demetilado (glicerina loira) variou de de 600 a 800 R\$/toneladas (Melo, 2011).

### 2.12.3. Utilização

O glicerol purificado é amplamente utilizado, suas finalidades mais tradicionais segundo Vasconcelos (2012) e Quispe (2013) são:

- Medicamentos - Na composição de embalagens e de fármacos;
- Alimentos - Mantêm a umidade de vários produtos;
- Cosmético - Evita o ressecamento de cremes, loções e sabonetes,
- Tecidos - Amaciam e flexibilizam as fibras;
- Papel - Usada como plastificante para elevar a resistência e a maleabilidade;

- Explosivos - Faz parte da nitroglicerina utilizada na fabricação de dinamite;
- Tabaco - Torna as fibras mais resistentes e evita o ressecamento das folhas;
- Lubrificantes - Na lubrificação das máquinas e equipamentos industriais;
- Tintas - Também presente na composição de vernizes e detergentes;
- Plásticos - Produção de PET, plásticos dos veículos automotores e eletrodomésticos.

A Figura 12 apresenta a divisão em termos percentuais, em escala mundial, destas utilizações.

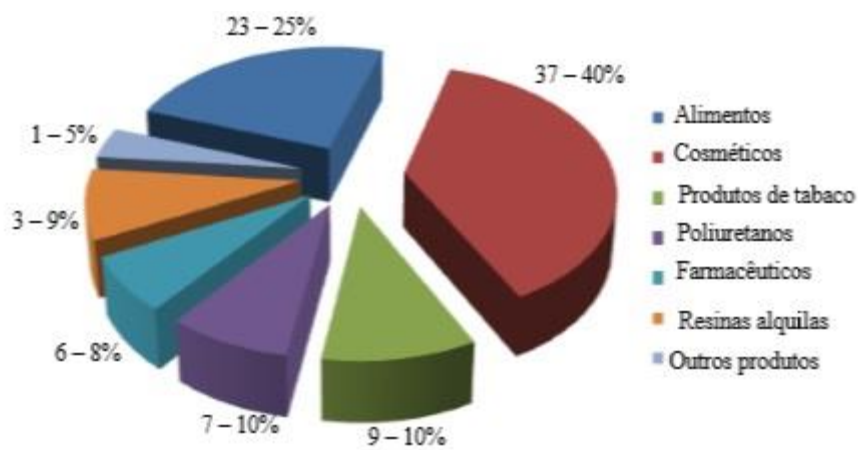


Figura 11: Aplicações tradicionais da glicerina em porcentagem mundial (STELMACHOWSKI, 2011)

Já em relação a glicerina bruta, diversos processos têm sido desenvolvidos objetivando sua utilização sem a necessidade das etapas de purificação. Um deles é o uso de glicerina bruta como fonte de carbono para crescimento microbiano em meio definidos quimicamente.

Melo (2011) utilizou a glicerina bruta para o crescimento de bactérias a serem empregadas em biorremediação de solos contaminados por hidrocarboneto;

Adhikari e colaboradores (2008) utilizaram a glicerina bruta para convertê-la a hidrogênio por reforma a vapor. O processo foi feito utilizando catalisadores níquelados, onde o que obteve maior área superficial e dispersão de metal foi o

Ni/CeO<sub>2</sub>. A seletividade máxima de H<sub>2</sub> foi de 74,7% e temperatura e 600°C e a conversão de glicerina bruta foi de 99% nessas condições;

Sabourin-Provost e Hallenbeck (2009) utilizaram a bactéria fotossintética *Rhodospseudomonas palustres* para conversão da glicerina bruta até hidrogênio. Os rendimentos encontrados foram de 6 moles de H<sub>2</sub>/mol de glicerina bruta (75% do rendimento teórico) e não foi observado efeitos de inibição e toxicidade;

Arechederra e Minteer (2009) utilizaram a glicerina bruta para produção de energia por meio de células biocombustíveis que a oxidam a CO<sub>2</sub> por uma cascata de 3 enzimas. O rendimento máximo de energia destas células biocombustíveis de glicerol/ar foi de 1,32 mW/cm<sup>2</sup> para 100mM de glicerol;

Krug e colaboradores (2011) usaram a glicerina bruta para substituir o uso de formol em laboratórios de anatomia pela técnica de glicerinação sem perder a qualidade da conservação das peças anatômicas e carcaças de animais e diminuindo o risco a saúde dos usuários;

Lage (2009) incluiu a glicerina bruta na dieta de cordeiros em substituição ao milho. O preço do milho pode representar até 70% da dieta destes animais e a adição na alimentação traz benefícios econômicos e não promovem efeitos na qualidade da carne;

Cordoba (2011) utilizou a combustão direta da glicerina bruta como alternativa de aproveitamento energético sustentável. Os níveis de acroleína não representam perigo para população e a energia produzida a partir da glicerina bruta ficou mais barata em 61% e 58% comparativamente ao óleo diesel e glicerina loira, respectivamente.

### **3. Objetivo**

#### **3.1. Geral**

Estudar a composição do meio de cultivo com a finalidade de obter elevadas produtividades com concomitante redução de custos para a produção de Lipase B de *Candida antarctica* em *P. pastoris* e ampliação de escala.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Estudar a utilização de um resíduo da produção de biodiesel como fonte de carbono (glicerina loira);
- Avaliar a melhor concentração de fonte de carbono para crescimento e produção da enzima;
- Avaliar a melhor temperatura para o crescimento e produção da enzima;
- Estudar diferentes estratégias de modo de condução do cultivo para maximização do crescimento celular e produção da enzima;
- Avaliar alternativas de fornecimento de oxigênio ao cultivo;
- Estudar a produção da a LipB recombinante em escala piloto (100L), mantendo a produtividade obtida em menor escala.

### **4. Materiais e métodos**

#### **4.1. Materiais**

A glicerina loira foi gentilmente cedida pela Petrobrás proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja.

Os reagentes utilizados e seus respectivos fabricantes são descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Fornecedores de cada reagente utilizado.

<b>Vetec</b>	Dextrose; sulfato de magnésio heptahidratado; cloreto de cálcio; agar agar; cloreto de potássio; fosfato de amônio dibásico; goma arábica; sulfato de cálcio; hidróxido de potássio; hidróxido de sódio; ácido cítrico; glicerol P.A.; hipoclorito de sódio; nitroprussiato de sódio; cloreto de zinco; cloreto de cobalto; sulfato de manganês; hidróxido de amônio; ácido sulfúrico; ácido fosfórico; sulfato cúprico; ácido bórico; sulfato ferroso; etileno diamino tetra-acético (EDTA); salicilato de sódio; iodeto de potássio
<b>Himedia</b>	extrato de levedura; peptona
<b>Tedia</b>	dimetil sufoxido; acetronitrila grau HPLC
<b>Merck</b>	molibdato de sódio
<b>Sigma-aldrich</b>	antiespumante 204; tributirina

## 4.2. Micro-organismo

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a levedura *Pichia pastoris* da linhagem selvagem X-33 transformadas anteriormente pela inserção de um vetor de expressão constitutiva pPGK $\Delta$ 3\_PRO\_LIPB, construído a partir de um gene sintético de lipase B de *Candida antarctica* (LipB) (Pedido de patente PI0905122-8), para expressão de lipase B de *C. antarctica* recombinante (LipB). A cepa foi produzida no laboratório do professor Fernando Torres na Universidade de Brasília.

## 4.3. Estocagem e inóculo

As células de *Pichia pastoris* transformadas foram armazenadas em glicerol 20% e mantidas a -80°C para estoque e em placas de petri com meio YPD 2% (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) com ágar-ágar 2% para serem utilizadas como inóculo.

As células conservadas na placa de petri foram propagadas em frascos agitados, a 200 rpm e 30°C, em meio YPD 2%.

#### 4.4. Meios de Cultivo

Para a fermentação nos biorreatores dois meios mínimos de sais foram utilizados, a composição deste está apresentada na Tabela 4:

Tabela 4: Composição de sais dos dois meios mínimos utilizados, pH utilizado e a fonte que foram obtidos.

	Meio BSM (g/L)	Meio mínimo (g/L)
Ácido cítrico	11,50	2,00
MgSO <sub>4</sub> 7.H <sub>2</sub> O	14,90	0,50
CaSO <sub>4</sub> 2.H <sub>2</sub> O	0,93	-/-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18,20	-/-
KOH	4,13	-/-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,00	-/-
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	4,25 ml	-/-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-/-	12,40
CaCl <sub>2</sub> 2.H <sub>2</sub> O	-/-	0,02
KCl	-/-	0,90
pH	6	7
Traço de sal	4,35 ml	4,60 mL
Fonte de carbono	40	40

<i>Fonte</i>	Zhang et al., 2007	Maurer et al., 2006
--------------	-----------------------	------------------------

A composição do traço de sal PTM<sub>4</sub> apresentada por Zhang e colaboradores (2007) e utilizada em ambos os meios, contém (por litro): 2 g CuSO<sub>4</sub> 5.H<sub>2</sub>O; 0,08 g KI; 3 g MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 0,2 MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O; 0,02 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,5 g CoCl<sub>2</sub> 6.H<sub>2</sub>O; 6,7 g ZnCl<sub>2</sub>; 21,7 g FeSO<sub>4</sub> 7.H<sub>2</sub>O; 0,2 g biotina; 1,7 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### **4.5. Condições de cultivo**

O biorreator utilizado foi da marca New Brunswick, modelo Bioflo 310 de 2 e 7 L. Durante o processo fermentativo tentou-se manter, por meio de um controle em cascata, o nível de saturação de oxigênio em 30%, com agitação variando entre 250-700 rpm e a vazão de gás, que neste caso foi ar comprimido, entre 0-1 vvm. A temperatura foi mantida a 30°C e o pH de trabalho foi controlado em 7,0 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% e NH<sub>4</sub>OH 20%.

Para os testes com oxigênio puro e estudo da concentração de inóculo foi utilizado o sistema multifor da Inforce, que consiste de quatro biorreatores de 500 mL que podem ser operados independentemente em diferentes condições. Assim efetuou-se um cultivo em replicatas biológicas dos ensaios conduzidos no biorreator de 2 e 7 L, mantendo-se os parâmetros acima, substituindo-se o ar por oxigênio puro, mantendo a OD em 30% da saturação.

Para os testes em escala piloto foi usado um sistema da Inforce modelo Techfors de 100 L, onde as condições de controle foram equivalentes as usadas nos biorreatores de 2 e 7 L.

#### 4.6. Medida de concentração celular

A quantificação do crescimento celular foi realizada por meio de uma curva padrão de massa seca relacionada a medida da densidade ótica a 600nm em espectrofotômetro. Para se obter a curva padrão da medida em massa seca, realizou-se um crescimento do micro-organismo em frasco agitado a 200rpm e 30°C, até fase estacionária de crescimento. A partir dele foram efetuadas diversas diluições e leituras sucessivas e paralelamente, uma amostra de 15 mL do meio fermentado foi filtrada a vácuo com membrana 0.45 µm. Em seguida, a membrana com célula foi seca em estufa, a 60°C, até massa constante.

Desta forma, foi possível correlacionar Concentração celular com Absorbância por meio de uma reta com coeficiente angular 0,4382.

#### 4.7. Medida de atividade lipásica por meio espectrofotométrico

Este método foi utilizado para acompanhamento cinético da produção da lipase de interesse. Ele se baseia na formação de um produto cromóforo (p-nitrofenol) a partir da reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato catalisada por lipases de acordo com a Figura 13.

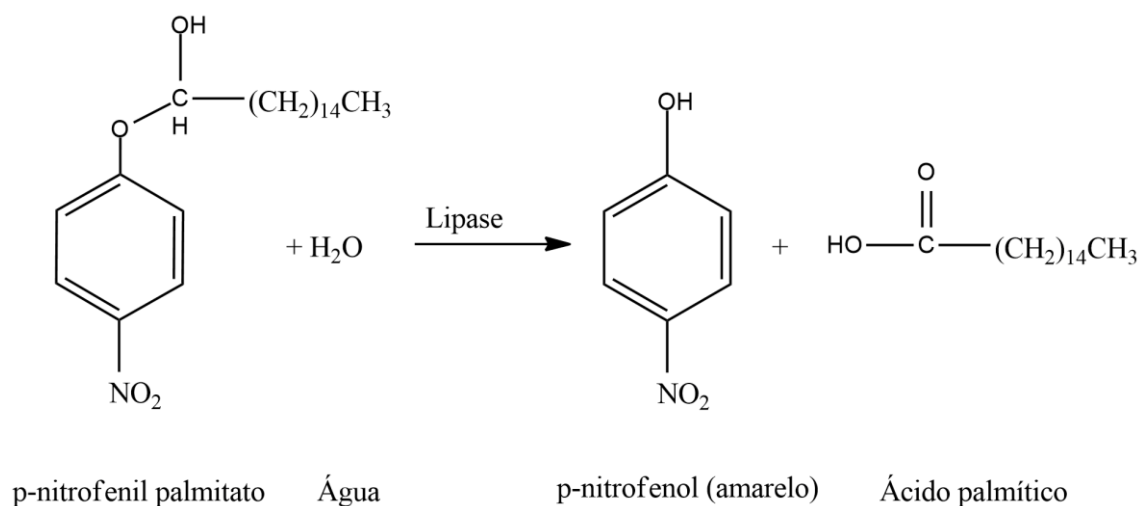


Figura 12: Reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato por lipases



Foi utilizado o leitor de microplacas ELISA para acompanhar a cinética de formação do p-nitrofenol a 412 nm e 30°C. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL da solução de p-nitrofenil palmitato 2,5 mM, juntamente com 176 µL de tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 e 4 µL de amostra. Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1,0 µmol de p-nitrofenil fenol por minuto nas condições de ensaio. O cálculo da atividade enzimática foi feito segundo a Equação 3:

$$A_L = \frac{(\alpha \cdot F \cdot V_f)}{V_a} \cdot F_d \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

$A_L$  = atividade (U/mL)

$\alpha$  = coeficiente angular da reta (Abs. x tempo)

$F$  = fator da curva padrão (Abs. x concentração de p-nitrofenol)

$V_f$  = volume final (mL)

$V_a$  = volume de amostra (mL)

$F_d$  = fator de diluição

#### **4.8. Medida de atividade lipásica por meio titulométrico**

O cálculo de rendimento e produtividade final de cada ensaio foi feita pela avaliação da atividade lipásica pelo método titulométrico utilizando tributirina como substrato. A tributirina (56mM) foi emulsionada por 3 minutos com goma arábica (5% m/v) em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0). O extrato enzimático (1 mL) foi adicionado a 19 mL de emulsão e incubado por 15 minutos (condição de velocidade inicial) a 40°C em banho com agitação de 200 rpm. A

reação foi interrompida pela adição de uma solução de acetona: etanol (1:1 v/v), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados (Figura 14).

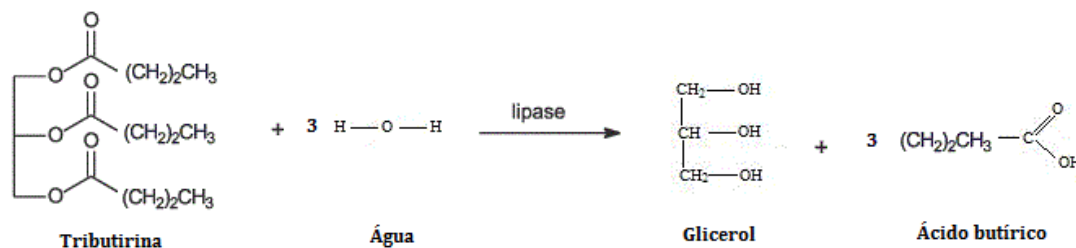


Figura 13: Reação de hidrólise da tributirina catalisada por lipase

Os ácidos graxos foram titulados com solução 0,06 N de NaOH em titulador automático até um valor de pH final de 11,0. Os brancos reacionais foram obtidos adicionando-se o preparado enzimático após a solução acetona: etanol. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio (Freire et al., 1997). O cálculo da atividade enzimática foi feito segundo a Equação 4.

$$A_L = \frac{(V - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot V_a} \quad \text{Eq 4}$$

Onde:

$A_L$  = atividade lipásica (U/mL)

$V$  = volume de solução de NaOH gasto para a titulação da amostra (mL)

$V_b$  = volume de solução de NaOH gasto para a titulação do branco (mL)

$M$  = molaridade da solução de NaOH (mmols/mL)

$t$  = tempo de reação (min)

$V_a$  = volume de amostra (mL)

#### **4.9. Concentração de proteínas totais**

A reação do corante coomassie brilliant blue G-250 com proteínas modifica a cor refletida de vermelho para azul e possibilita a quantificação das proteínas totais na amostra, o procedimento se encontra descrito por Bradford (1976). A leitura foi feita no leitor de microplacas ELISA a 595 nm em microplacas de 96 poços contendo 0,01 mL da amostra e 0,19 mL do reagente de Bradford da Bio-Rad.

#### **4.10. Concentração de nitrogênio**

A reação entre amônia, fenol e hipoclorito possibilita a quantificação do nitrogênio da ureia formada de acordo com a metodologia adaptada de Fawcett e Scott (1960) e Tabacco e colaboradores (1979). A leitura foi feita em leitor de microplacas ELISA a 600nm, em microplacas de 96 poços contendo 0,01 mL de amostra, 0,095 mL do reagente 1 e 0,095 mL do reagente 2 (ambos identificados nas metodologias de referência).

#### **4.11. Concentração de glicerol**

A determinação de glicerol foi efetuada por HPLC (HPLC Agilent Technologies) equipado com coluna HPX-87H (BioRad - 300mm x 7.8 mm). A temperatura foi mantida em 65°C, utilizando como fase móvel uma solução 0,005 M de ácido sulfúrico a vazão de 0,6 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

#### **4.12. Eletroforese em gel de resolução**

A mistura para o gel de resolução 12%, desnaturante, foi preparada misturando-se em um recipiente 11 mL de solução estoque de mistura de acrilamida 30%, 3,8 mL de tampão Tris/HCl 1,5M pH 8,8, 4,9 mL de H<sub>2</sub>O, 6 µL de TEMED, 150 µL de persulfato de amônio e 150 µL de SDS 10%. A mistura foi suavemente agitada e então aproximadamente 10 mL foram adicionados entre as placas de vidro do sistema de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, da BioRad, até que o topo da cuba fosse atingido. Imediatamente após a adição da mistura, o pente para a criação de poços foi colocado, e o sistema deixado em repouso

por aproximadamente 1h a temperatura ambiente. A eletroforese foi feita a temperatura ambiente, 300 mV, 30 mA por gel, durante 30 minutos.

#### 4.13. Cálculo dos parâmetros

A fim de realizar comparações entre as fermentações quatro parâmetros principais foram utilizados: Rendimento de atividade de lipase produzida por biomassa obtida, produtividade mássica, atividade lipásica específica e taxa específica de crescimento.

A equação 5 mostra o cálculo do rendimento de atividade de lipase produzida por biomassa obtida.

$$Y_{p/x} = \frac{U_{tf}}{X_f - X_i} \quad \text{Eq. 5}$$

Sendo,  $Y_{p/x}$  = rendimento de atividade de lipase produzida por biomassa obtida (U/g);  $U_{tf}$  = atividade lipásica por titulometria ao final da fermentação (U/L);  $X_f$  = biomassa presente ao final da fermentação (g/L);  $X_i$  = biomassa presente ao início da fermentação (g/L).

A equação 6 mostra o cálculo da produtividade mássica.

$$Q_p = \frac{U_{tf}}{X_f * T_f} \quad \text{Eq. 6}$$

Sendo,  $Q_p$  = produtividade mássica (U/g.h);  $U_{tf}$  = atividade lipásica por titulometria ao final da fermentação (U/L);  $X_f$  = biomassa presente ao final da fermentação (g/L);  $T_f$  = tempo final da fermentação (h - definido pelo esgotamento da fonte de carbono).

A equação 7 mostra o cálculo da atividade lipásica específica.

$$U_{esp} = \frac{U_{tf}}{p} \quad \text{Eq. 7}$$

Sendo,  $U_{esp}$  = atividade lipásica específica (U/mg);  $U_{tf}$  = atividade lipásica por titulometria ao final da fermentação (U/L);  $p$  = proteínas totais presentes ao final da fermentação (mg/L).

A taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) foi calculada através do ajuste exponencial da fase log de crescimento a unidade em que se apresenta é  $h^{-1}$ .

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Definição do meio de cultivo

Inicialmente foram analisadas diferentes fontes de carbono e concentrações de sais a fim de reduzir os custos associados ao meio de cultivo com concomitante aumento da produção.

Foram testados dois meios mínimos de sais encontrados na literatura. O primeiro com maior concentração de sais, descrito por Zhang e colaboradores (2007), chamado de BSM e o segundo com uma concentração mais baixa, descrito por Maurer e colaboradores (2006). Ambos foram comparados com o meio rico em nutrientes YPD 2%, que é largamente utilizado em cultivos microbianos já que seus nutrientes são facilmente assimilados e proporcionam um ambiente propício ao crescimento celular.

Este teste inicial foi realizado em frascos agitados com o objetivo de investigar a influência do meio de cultivo nos parâmetros fermentativos, tais como: produtividade, crescimento microbiano e atividade específica. É importante destacar que a cepa de *Pichia Pastoris* com a inserção da lipase B de *Candida antarctica* acoplada a um promotor constitutivo faz com que a produção seja associada ao crescimento.

Na Figura 15 estão descritos os resultados utilizando meio YPD 2%, BSM e mínimo para os cultivos realizados em frascos agitados aletados de 1L com 200 mL de meio de cultivo a 250 rpm, 30 °C e pH inicial de 7,0.

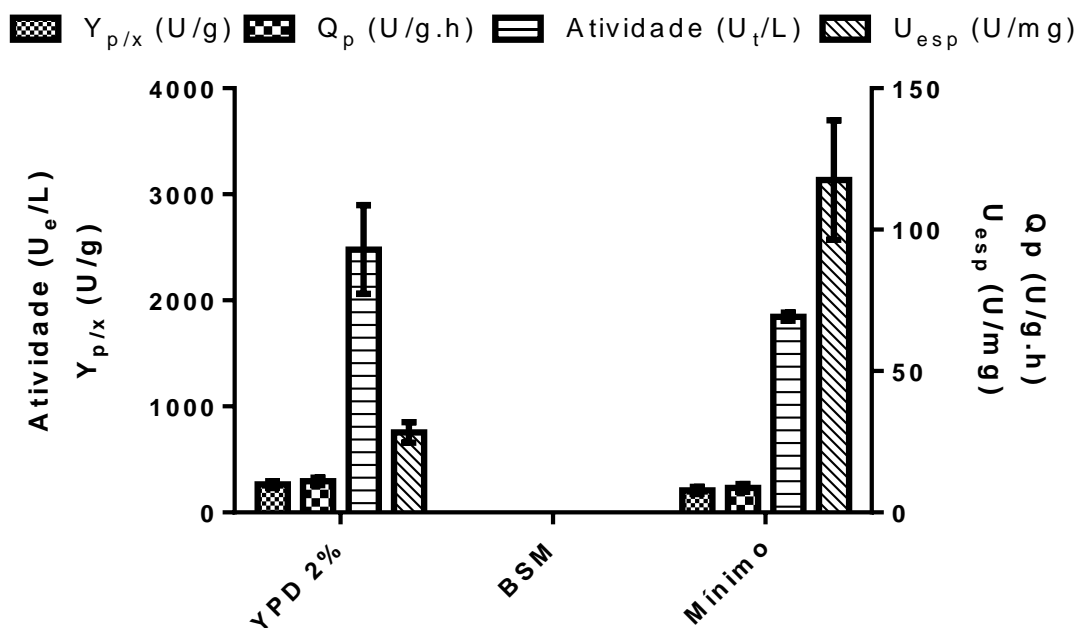


Figura 14: Comparação dos parâmetros obtidos após 24h de crescimento nos meios YPD 2%, BSM e mínimo com glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Os resultados indicam que no meio BSM não houve produção nem crescimento expressivo em até 24 horas de cultivo. Este meio possui uma elevada concentração de sais e pode ter exposto as células a uma elevada pressão osmótica. Nesta situação a fase de adaptação celular foi de 20 horas e somente após 48 horas a fonte de carbono foi completamente exaurida do meio indicando final do crescimento. Nestas condições o meio BSM produziu atividade enzimática e rendimento de lipase produzida por grama de biomassa ( $Y_{p/x}$ ) equivalentes aos demais meios testados, entretanto sua produtividade foi muito baixa devido a extensão da fase de adaptação celular.

O rendimento ( $Y_{p/x}$ ) e a produtividade obtidos no meio mínimo foram bem similares quanto aos obtidos no meio rico. No entanto, a atividade específica, foi 4,2 vezes superior à obtida no meio rico. Este resultado pode ser explicado pela complexidade do meio rico que já apresenta uma certa quantidade de proteínas

em sua composição, provenientes do extrato de levedura e peptona de carne, influenciando desta forma, no valor deste parâmetro. O meio mínimo, por ser quimicamente definido, além de maximizar a atividade específica ainda facilita a purificação posterior da enzima de interesse.

O custo do meio de cultivo YPD e mínimo foi de 51,98 reais por litro e 5,77 reais por litro, respectivamente. Nesta avaliação preliminar comparativa foram considerados preços de mercado no varejo do ano de 2014. A diminuição de 88,9% no custo do meio somado aos resultados de atividade específica superior (aumento de 4 vezes), produtividade e rendimento similares levou a escolha deste meio quimicamente definido para a continuidade deste trabalho.

## **5.2. Comparação entre meios quimicamente definidos em biorreator**

Os dois meios de cultivo quimicamente definidos foram novamente estudados em biorreator já que as condições operacionais mais estáveis e controladas poderiam gerar em resultados diferentes dos obtidos em frascos agitados.

Os cultivos foram conduzidos em biorreator de 7,5 L com 5L de volume útil onde o pH foi controlado em 7,0 com hidróxido de amônio 20% e ácido sulfúrico 5%. A oxigenação foi realizada por injeção de ar comprimido definida por um controle em cascata, cuja agitação variou de 250 a 700 rpm e a entrada de ar na faixa de 0 a 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) para manutenção do oxigênio dissolvido em 30%.

Nas Figuras 16 e 17 estão representadas as cinéticas de produção e consumo em meio BSM e meio mínimo, respectivamente, com 40 g/L iniciais de fonte de carbono e 30 °C.

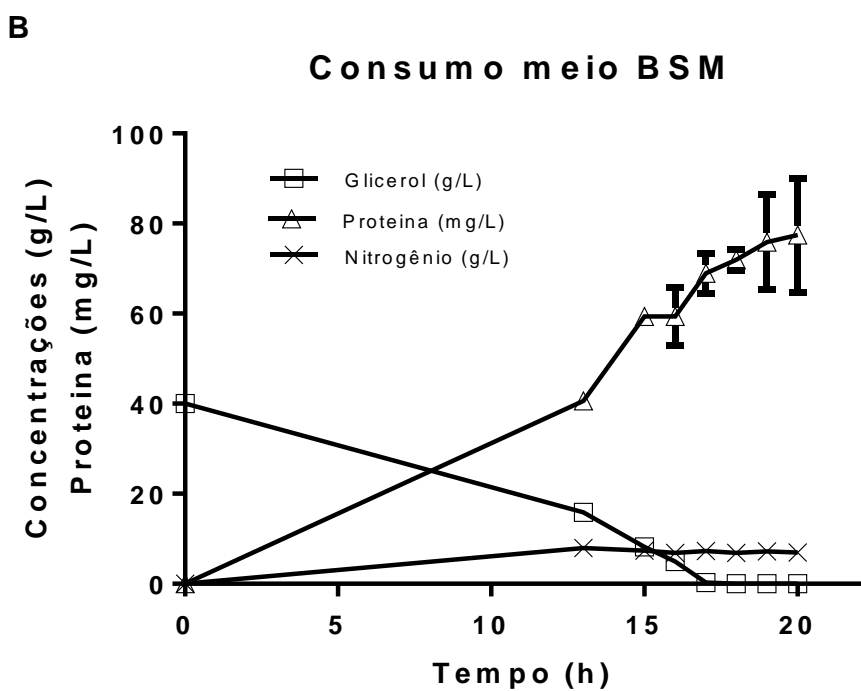
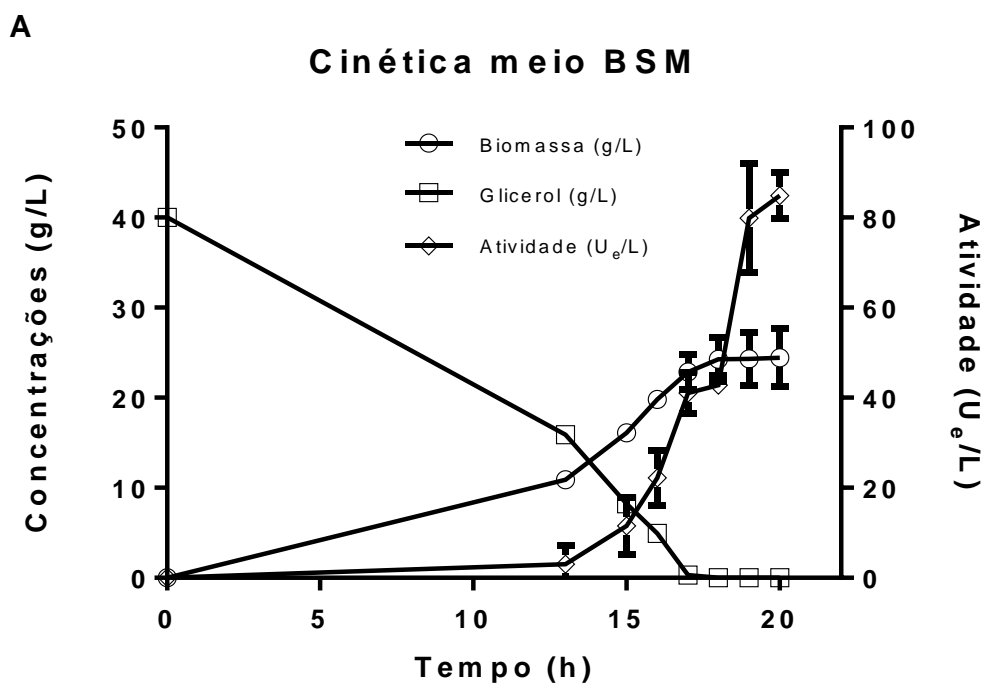


Figura 15: Cinética do cultivo de *P.pastoris* utilizando meio BSM com 40g/L de glicerol iniciais a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.



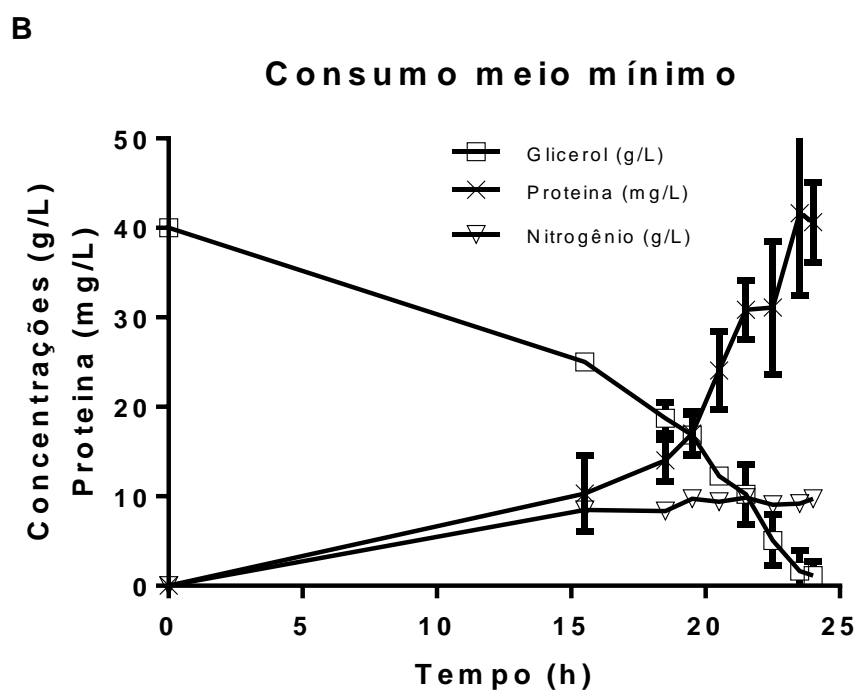
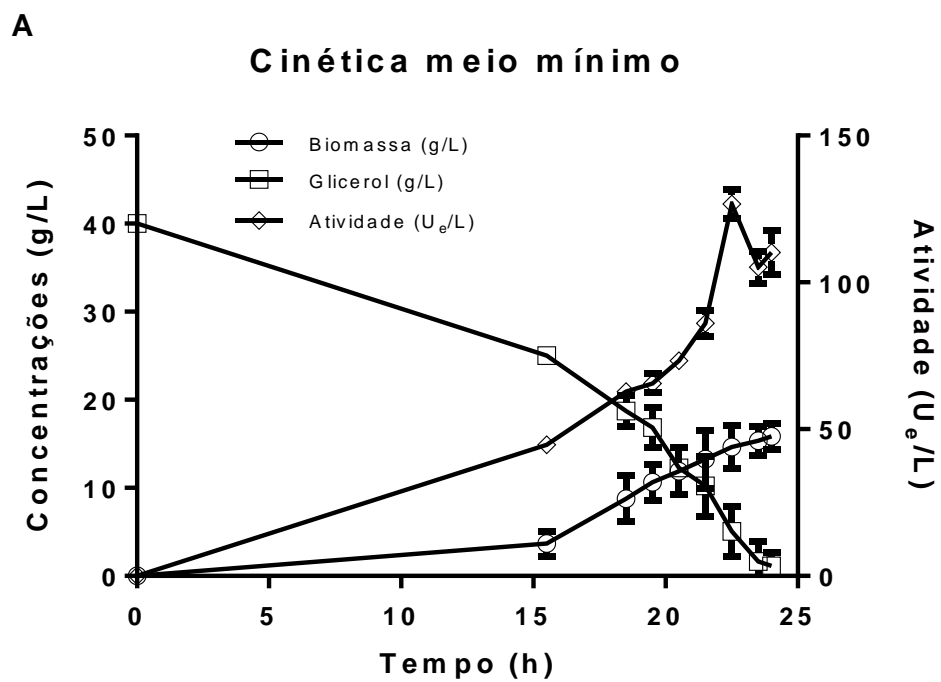


Figura 16: Cinética do cultivo de *P.pastoris* utilizando meio mínimo com 40g/L de glicerol iniciais a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Observando as cinéticas nos dois meios é possível verificar que, em ambos os casos (Figura 16A e 17A), a produção da LipB é associada ao crescimento pois a concentração desta no meio aumenta juntamente com o aumento da concentração celular. Além disso, observa-se que não houve limitação de nitrogênio ao longo do cultivo, visto que o hidróxido de amônio atuou como fonte de nitrogênio além de manter o pH do meio de cultivo. A manutenção do pH em 7,0 e o cultivo em condições não limitantes em nitrogênio foram importantes para a manutenção da atividade enzimática ao longo de cultivo, uma vez que esta enzima não é estável em pHs ácidos e a produção de proteases é evitada com a condição de nitrogênio não limitante. (Lattari, 2011).

Outro ponto a se observar é que o rendimento de célula por substrato ( $Y_{x/s}$ ) em ambos os casos ficou em torno de 0,5 e a taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) em  $0,2 \text{ h}^{-1}$ , este resultado está de acordo com os resultados obtidos por outros autores como Zhang e colaboradores (2007) que obtiveram cerca de 28g/L de concentração celular ao final do cultivo com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de  $0,17 \text{ h}^{-1}$  utilizando o meio BSM e Maurer e colaboradores (2006), que obtiveram, utilizando meio mínimo, cerca de 21g/L de células em batelada comum e  $0,2 \text{ h}^{-1}$  de taxa específica de crescimento.

Usualmente, o promotor indutivo controlado pela presença de metanol, o AOX1, é o mais amplamente utilizado na literatura. Tal promotor é ativado pelo consumo de metanol, e neste cenário Eom e colaboradores (2013) e Vadhana e colaboradores (2013) utilizaram o meio BSM em biorreatores para produção de lipase B de *Candida antarctica* expressa em *P.pastoris*. Os autores obtiveram 12 U/ml e 300 U/ml de atividade enzimática após 5 e 6 dias de indução, respectivamente. No segundo caso, os autores testaram peptídeos sinais diferentes e o resultado se refere ao melhor entre eles.

A Figura 18 compara produtividade, atividade e atividade específica obtidas em bateladas a  $30^\circ\text{C}$ , pH 7,0, com 40 g/L iniciais de glicerol em ambos os casos estudados.

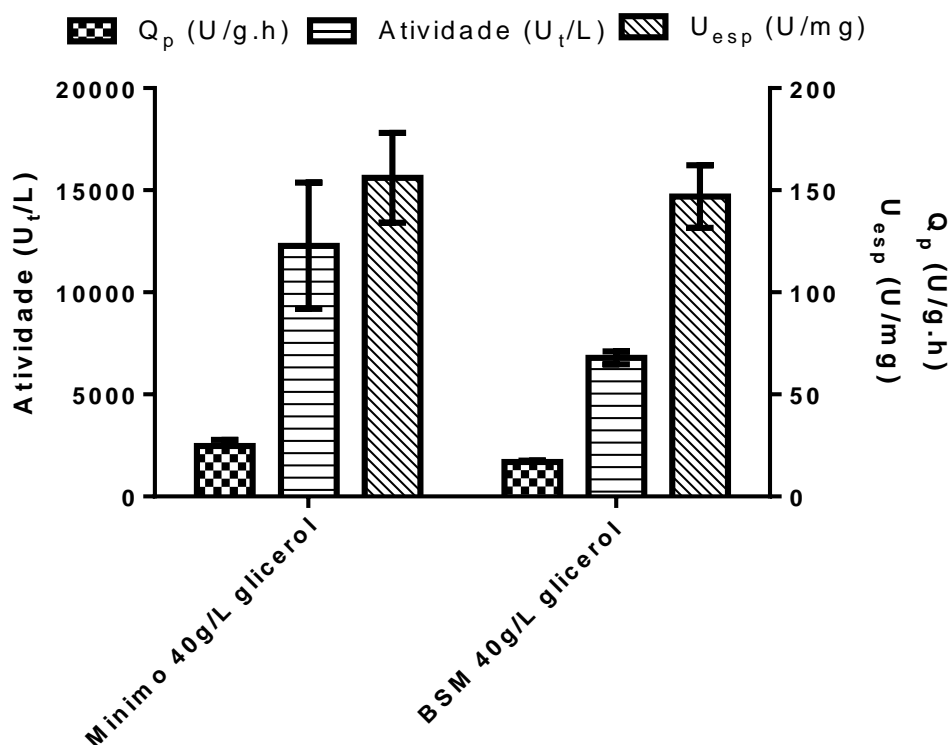


Figura 17: Produtividade, atividade e atividade específica obtidas com meio BSM e mínimo com 40g/L de glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

A atividade específica os dois meios quimicamente definidos atingiram valores similares, no entanto, a atividade por litro de sobrenadante foi 2 vezes maior no meio mínimo. Outro parâmetro importante na definição de um processo fermentativo é a sua produtividade, pois o resultado gerado nos fornece informações sobre a atividade enzimática, crescimento celular, além do tempo de fermentação. O meio mínimo apresentou uma produtividade 45,9% maior comparativamente ao meio BSM.

### 5.3. Avaliação da fonte de carbono

Além da avaliação do meio de cultivo inicial mais apropriado, onde diferentes sais e suas respectivas concentrações foram avaliadas, a utilização de resíduo como substrato foi avaliada objetivando a redução de custos e o aumento da produtividade. No entanto, a mudança da fonte de carbono deve ser avaliada

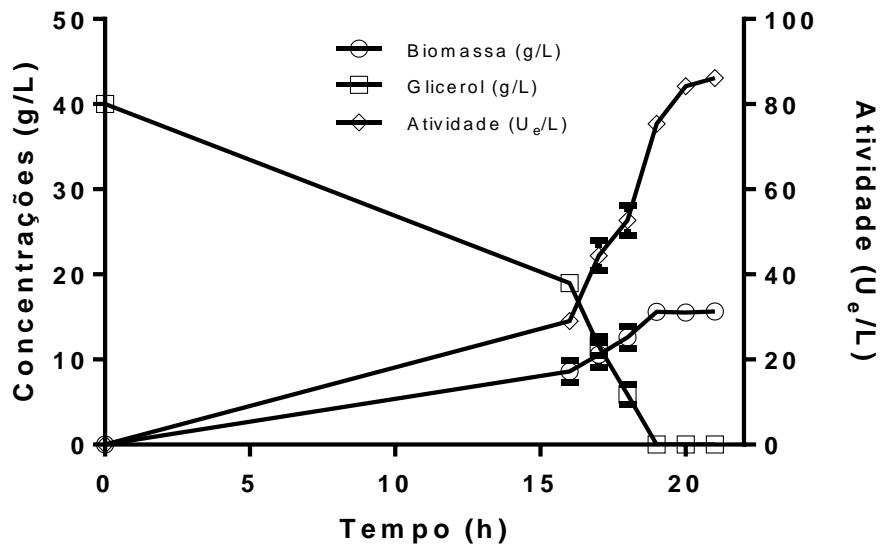
com cautela, já que resíduos, por apresentarem grande variabilidade entre lotes podem gerar sérios problemas no processo, tais como: formação de subprodutos (por exemplo, ácido acético), lise celular, efeitos inibitórios e metabólitos desconhecidos (Kim et al., 2013a).

Neste trabalho, optou-se em substituir o glicerol P.A. pela glicerina loira proveniente da produção de biodiesel de soja. Apesar de não estar totalmente caracterizada, este resíduo apresenta 84% de pureza, em torno de 1000 ppm de metanol e 7g/L de cloreto de sódio (dados fornecidos pela Petrobras).

A Figura 19 mostra a cinética de produção da Lip B, proteínas totais, crescimento de biomassa e consumo de glicerina loira, com 40 g/L de fonte de carbono inicial.

A

### Cinética meio mínimo glicerina loira



B

### Consumo meio mínimo glicerina loira

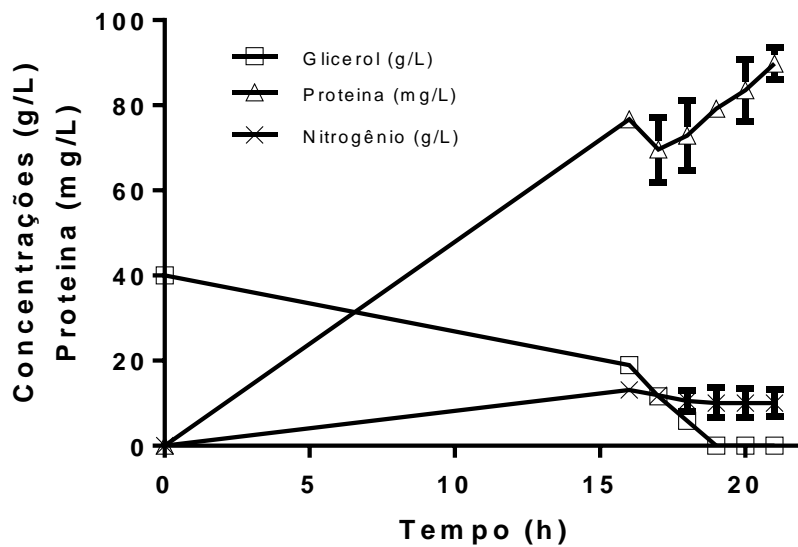


Figura 18: Acompanhamento de fermentações com meio mínimo e glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

A produção de enzima para ambas as fontes de carbono apresenta-se associada ao crescimento e ambos cultivos foram conduzidos em condições não limitantes de nitrogênio.

O tempo até o consumo total da fonte de carbono foi de 18h (Figura 19) e 24h (Figura 17), para os cultivos conduzidos com glicerina loira e glicerol PA, respectivamente. Este fato provavelmente ocorreu em função das impurezas presentes na glicerina loira, principalmente o metanol, que também pode ser utilizado como fonte de carbono para esta levedura.

A Figura 20 resume os parâmetros calculados em bateladas com 40 g/L iniciais de fonte de carbono utilizando glicerol P.A. e glicerina loira a 30 °C e pH 7,0.

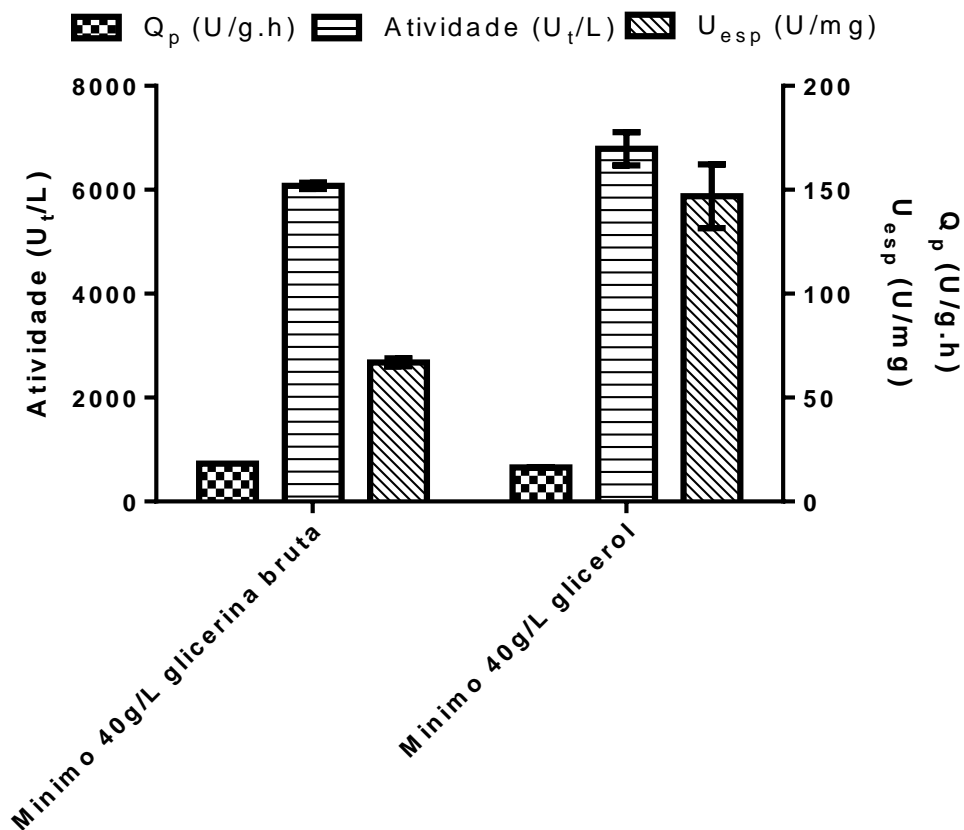


Figura 19: Produtividade, atividade e atividade específica obtidas com meio mínimo utilizando 40g/L de glicerol e glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Comparando os parâmetros obtidos nos cultivos conduzidos com diferentes substratos é possível verificar que tanto a produtividade (13,4 U/g.h) quanto a atividade (6138 U/L) são similares, considerando os desvios padrões.

Os valores da atividade específica obtidos para os cultivos realizados com glicerol PA e glicerina loira foram 148 U/mg e 65 U/mg, respectivamente. O fato do valor ser menor quando o cultivo foi realizado em glicerina loira pode estar associado a presença de impurezas que podem afetar a quantificação das proteínas totais no sobrenadante da fermentação.

O custo do meio de cultivo com o glicerol PA e a glicerina loira foi de 5,77 reais por litro e 1,63 reais por litro, respectivamente. Nesta avaliação preliminar comparativa foram considerados preços de mercado no varejo do ano de 2014. A diminuição de 72 % no custo do meio associado aos bons resultados obtidos com o uso deste coproduto nos levou a utilizar, para continuidade deste estudo, o meio mínimo de sais com glicerina loira como fonte de carbono.

Estes resultados demonstram a viabilidade de utilização da glicerina loira para produção de produtos com valor alto agregado, como a lipase em questão. Eles estão consonância com o apelo da química verde de aproveitamento e aumento de valor agregado de resíduos e coprodutos que são tão importantes atualmente.

#### **5.4. Estudo da concentração inicial de substrato**

A avaliação da concentração inicial de substrato é importante para o estudo do comportamento fisiológico da cepa em relação a limitação ou excesso de carbono no meio de cultivo. Estes experimentos visaram a obtenção da maior concentração de biomassa possível, sem o efeito de inibição pelo substrato.

Esse tipo de inibição acontece principalmente no início de um cultivo descontínuo ou em batelada, onde a concentração de substrato é elevada o suficiente para que esta molécula atue como inibidor. Caso a relação C/N seja elevada suficiente para que o efeito inibitório ocorra a fase lag será estendida diminuindo a produtividade do sistema.

A variação da concentração de glicerol inicial nos cultivos em batelada de *P.pastoris* para produção de LipB são apresentadas na Figura 21. Foram avaliadas 5 diferentes concentrações iniciais de carbono (40, 60, 80, 100 e 150 g/L).

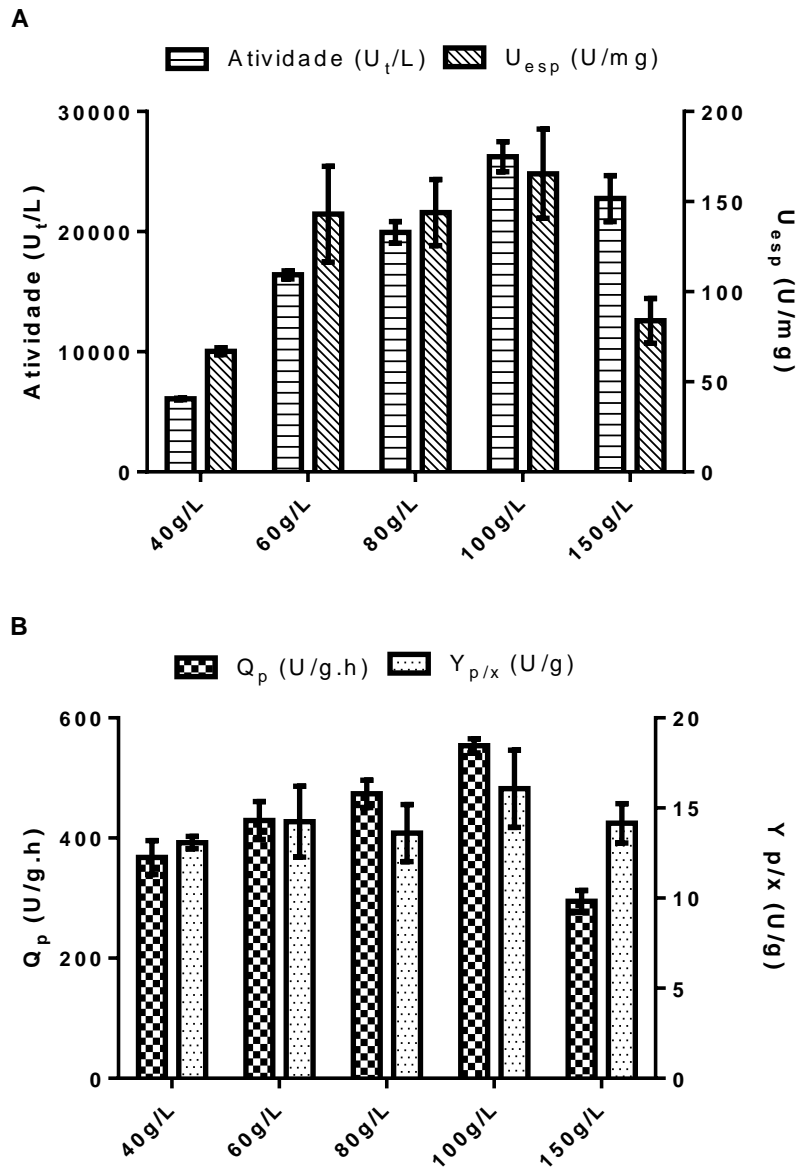


Figura 20: Comparação entre parâmetros de fermentação nas diferentes concentrações iniciais de carbono (40, 60, 80, 100 e 150 g/L) a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

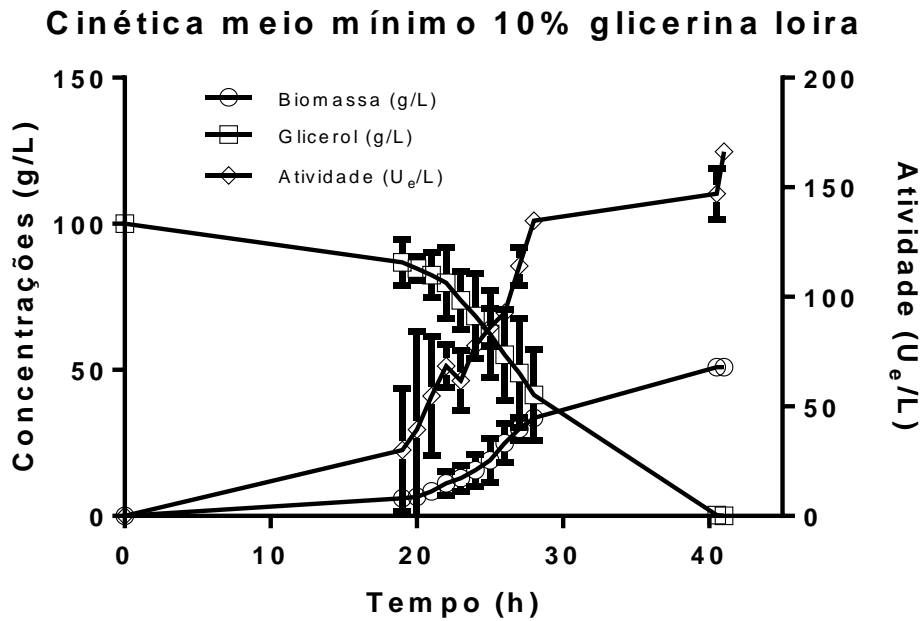


A atividade e a atividade específica aumentaram gradativamente com o aumento da concentração de substrato de 40g/L (6789 U/L e 71 U/mg) até 100g/L (24128 U/L e 163 U/mg). Este aumento proporcional era esperado, visto que a concentração de células também aumentou (Figura 22). Tal fato só não é observado quando se utilizou 150 g/L de glicerina loira, nesta concentração ocorreu uma queda na atividade e atividade específica possivelmente pela inibição do crescimento celular em elevadas concentrações de substrato que chegou somente a 61 g/L, biomassa similar a concentração de 100 g/L, que atingiu 51 g/L.

O rendimento de lipase produzida por grama de biomassa e a produtividade atingiram o valor máximo no cultivo utilizando 100g/L de glicerina loira, ambos decaíram 22,2 e 45,5 %, respectivamente, quando comparado ao cultivo com 150g/L iniciais de fonte de carbono.

A Figura 22 apresenta o acompanhamento cinético de consumo de glicerol, nitrogênio e produção de biomassa, proteínas totais e lipase B de *Candida antarctica* na melhor condição em batelada com 100 g/L de glicerina loira.

A



B

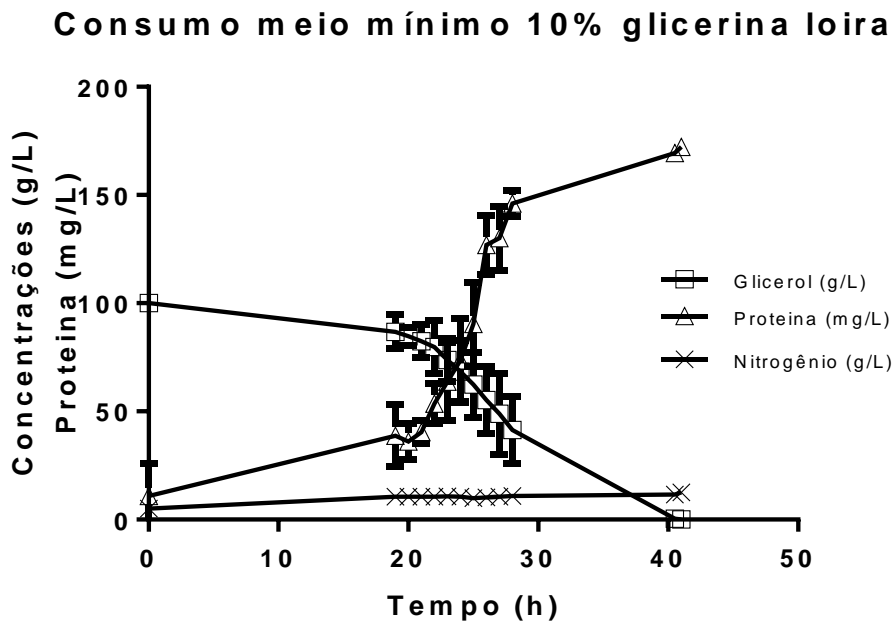


Figura 21: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira como fonte de carbono a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

De acordo com a cinética acima, a fase lag da batelada com glicerina loira se estendeu um pouco mais (5h) representando um aumento de 1,4 vezes em relação a com glicerol. A produção de enzima e proteína acompanha o crescimento de biomassa, como esperado, e o nitrogênio não se esgota durante todo o período.

### **5.5. Efeito da concentração de inóculo**

Com o objetivo de diminuir a fase de adaptação celular e desta forma, aumentar a produtividade do processo, foram avaliadas diferentes concentrações de inóculo. Diferentes concentrações foram testadas: 1g/L, concentração padrão na qual todos os cultivos foram iniciados até aqui, 1,5 e 2 g/L.

No entanto, para atingir as duas últimas concentrações, seria necessário adicionar um grande volume de pré-inóculo ao biorreator para dar início a fermentação. Desta forma, a fim de manter, no máximo, 10% de mistura do meio de cultivo com o meio de pré-inóculo, foi necessário centrifugar e resuspender as células quando as concentrações de inóculo foram superiores a 1 g/L.

A Figura 23 apresenta a cinética de crescimento celular e consumo da fonte de carbono por *P. pastoris* em diferentes concentrações de inóculo.

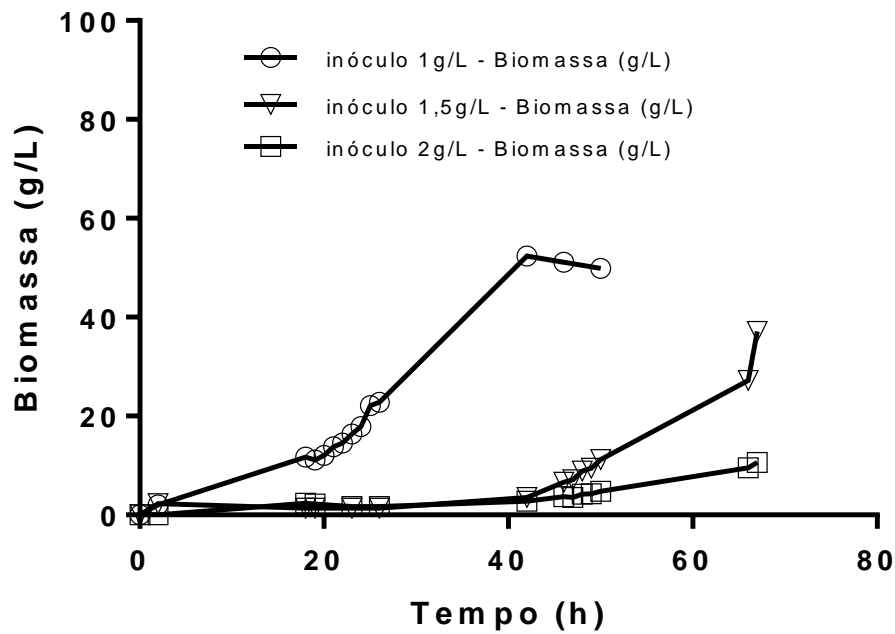
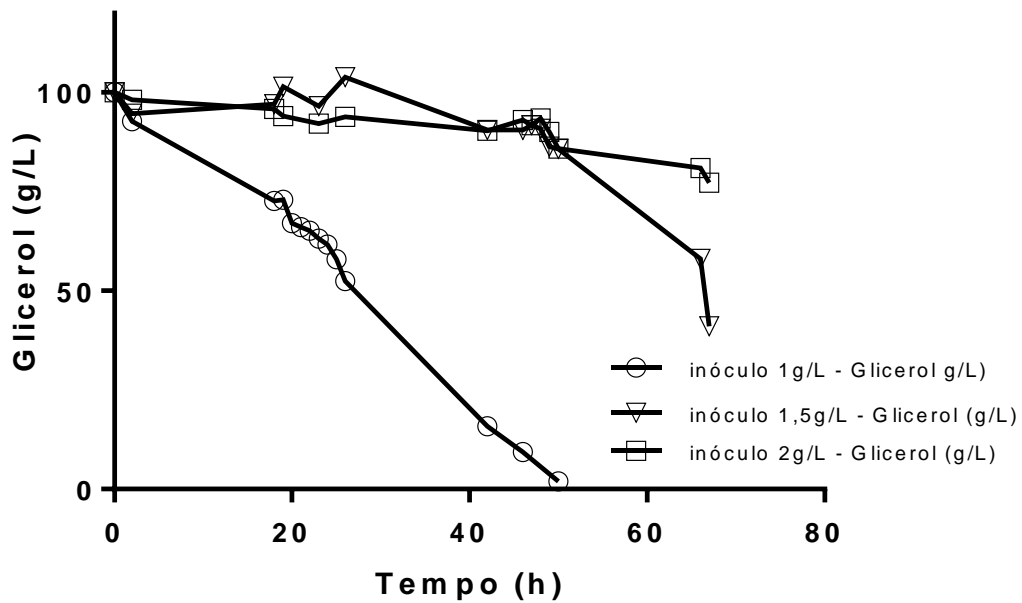


Figura 22: Acompanhamento do consumo de glicerol e crescimento celular com inóculo inicial de 1, 1,5 e 2g/L a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Diferente do que se esperava, o aumento da concentração de inóculo não reduziu consideravelmente a fase de adaptação celular, pelo contrário, o tempo de adaptação quase triplicou. Isso se deve, provavelmente ao fato de que o inóculo que não é submetido a centrifugação (1 g/L), introduz no cultivo um pouco dos nutrientes provenientes do meio rico (YPD 2%) que age como uma suplementação e, por isso, pode ter reduzido a fase de adaptação celular.

Após 70h de cultivo o glicerol presente, nas fermentações com maior concentração de inóculo, ainda não tinha sido totalmente consumido, enquanto que com inóculo de 1g/L o glicerol já havia terminado com 40h de cultivo (Figura 23).

## **5.6. Efeito da temperatura**

A temperatura de condução de um determinado bioprocessos, especialmente no caso deste estudo, onde o produto de interesse é uma enzima extracelular é extremamente relevante pois tanto o crescimento celular quanto a atividade final são afetados por este parâmetro.

A Figura 24 apresenta os resultados de atividade (A), produtividade e rendimento (B) obtidos nos cultivos realizados nas temperaturas de 20, 30 e 35°C.

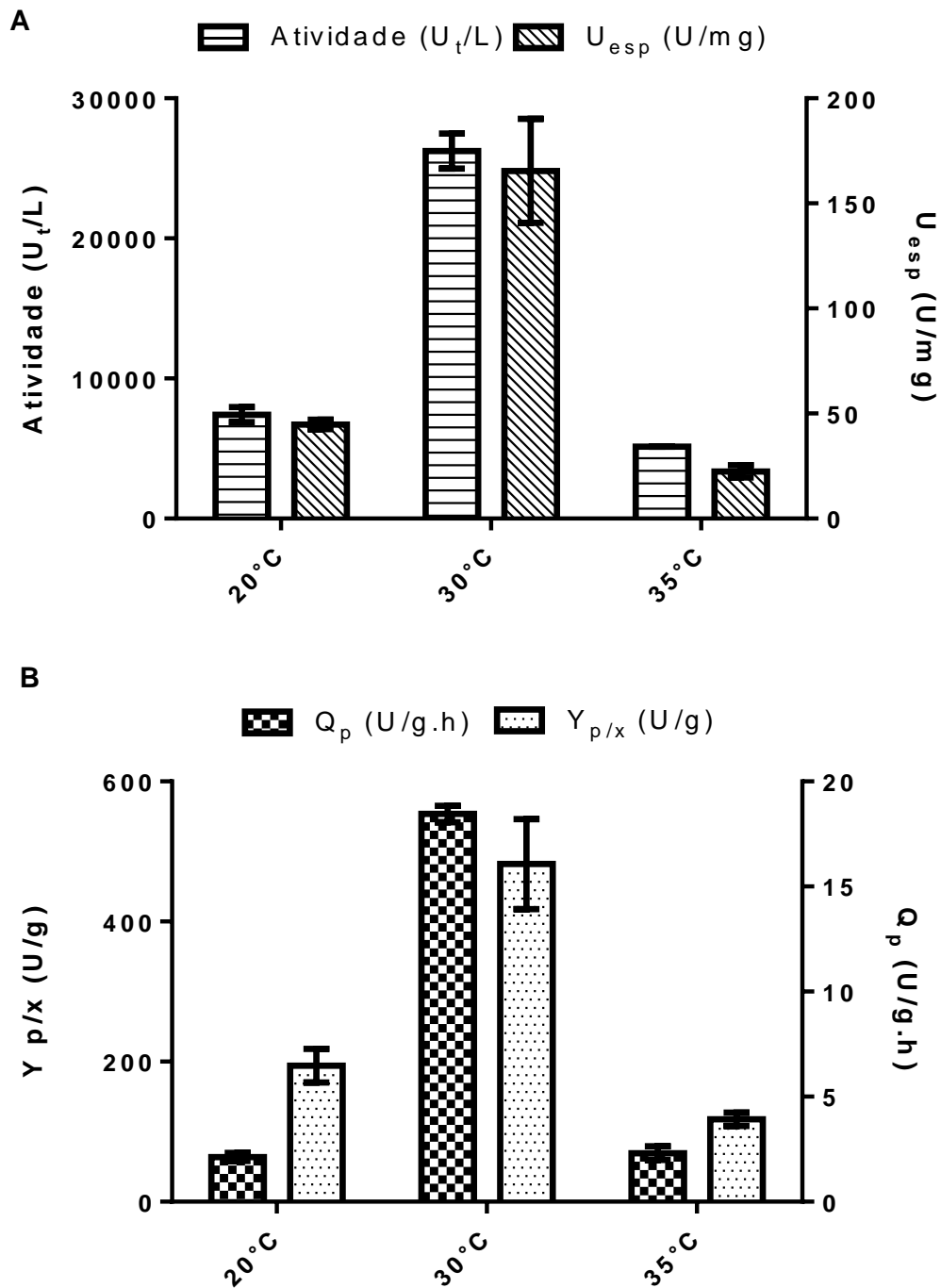


Figura 23: Parâmetros obtidos ao final do cultivo em 20, 30 e 35°C com 100g/L de glicerina loira, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

A temperatura de 30°C foi a melhor tanto para a atividade enzimática (24128 U/L) como para a produtividade (17 U/g.h) e rendimento do cultivo (471 U/g.h). A biomassa final nesta condição é de 51 g/L com  $\mu=0,18 \text{ h}^{-1}$ , após 40h de fermentação.

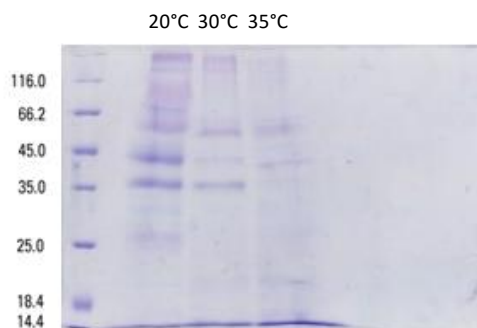
Para o ensaio a 20°C foi possível observar um aumento da fase de adaptação celular, em torno de 200%, chegando a 54h, a taxa específica de crescimento foi de  $\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$  e, ao final da fermentação (após 84h) a biomassa atingiu valor equivalente as outras temperaturas, de 48 g/L. Isso ocorre possivelmente devido à desaceleração do metabolismo celular em menores temperaturas.

A 35°C a taxa específica de crescimento foi a maior de todas,  $\mu=0,26 \text{ h}^{-1}$  e a concentração celular foi equivalente as temperaturas anteriores, no entanto, ao final da fermentação a atividade lipásica foi 4 vezes menor que na temperatura de 30°C, este fato ocorre provavelmente em decorrência a desnaturação de enzimática devido à alta temperatura.

Estes resultados não corroboraram com a hipótese levantada por Jahic e colaboradores (2003). Estes autores propuseram que a diminuição da temperatura de cultivo, reduziria a taxa específica de crescimento, a morte celular e a proteólise, aumentando assim o acúmulo de produto. Segundo os autores, as enzimas produzidas seriam enoveladas mais eficientemente e, portanto, com maior atividade.

Outros autores como Sirén e colaboradores (2006) e Surribas e colaboradores (2007) também suportaram essa hipótese verificando significativa redução na morte celular e um aumento de 1,3 vezes na produtividade e pureza final do produto, para os cultivos entre 10°C e 30°C.

Na Figura 25 é apresentado o resultado da eletroforese 1D feito com o sobrenadante das três temperaturas.



*Figura 24: Eletroforese em gel de resolução do sobrenadante obtido ao final das fermentações em 20, 30 e 35°C com 100g/L de glicerina loira, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.*

Acima podemos ver que há uma maior concentração de proteínas na banda equivalente a 33 KDa na temperatura mais baixa (20°C), ou seja, apesar de ter mais proteínas produzidas, as mesmas não foram mais ativas o que indica que esta temperatura não é de fato interessante para este cultivo.

Já no caso de temperaturas superiores a 30°C, ocorre possivelmente desnaturação proteica e, portanto, redução da atividade enzimática e também o desaparecimento da banda da enzima de interesse (Figura 25). A enzima produzida pode não ser estável (Lattari, 2011) e por isso não mantém sua atividade até o final do cultivo.

Os resultados obtidos após os experimentos (Figura 24 e 25) não deixam dúvida de que 30°C é a temperatura ideal para este processo fermentativo, tanto para o crescimento celular quanto para a produção da lipase, que se mantém ativa ao longo do processo.



## 5.7. Avaliação das condições de oxigenação

Durante os cultivos foi observado que durante a fase exponencial de crescimento, a taxa de transferência de oxigênio foi inferior à demanda de oxigênio celular e, portanto, não ocorria a manutenção do oxigênio dissolvido (OD) em 30% da saturação conforme definido na cascata de controle de acordo com o utilizado por Arnau e colaboradores (2010).

A Figura 26 apresenta a curva de suprimento de oxigênio ao longo do cultivo com injeção de ar comprimido ao biorreator. É possível verificar que entre 22 e 30 horas o oxigênio fornecido não foi suficiente para manter o nível de oxigenação em 30% da saturação.

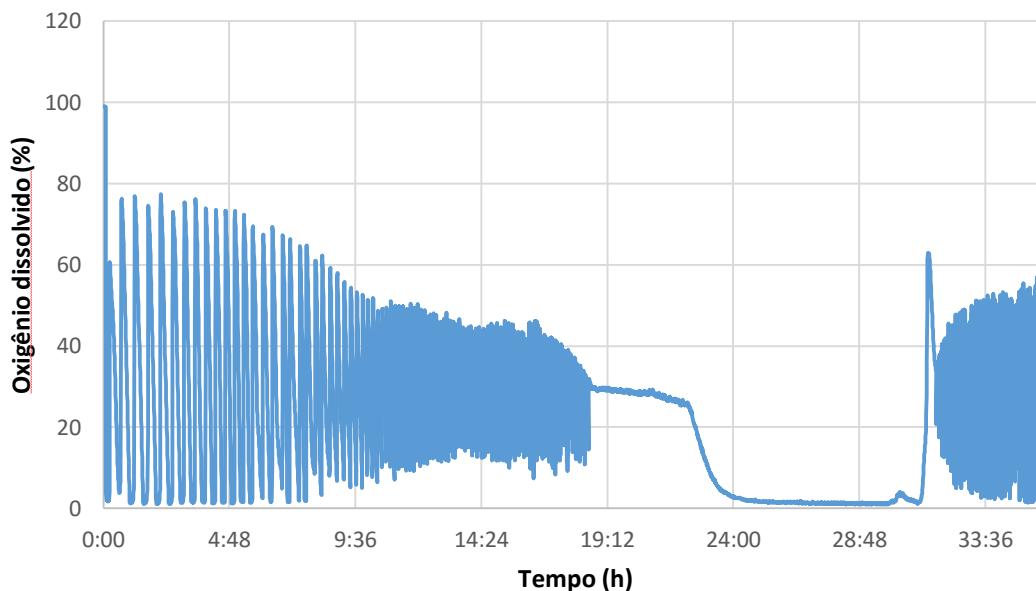


Figura 25: Padrão de oxigênio dissolvido em cultivo de *Pichia pastoris* em batelada aerada com ar comprimido com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

O consumo total do oxigênio dissolvido durante o intervalo citado de cultivo significa que todo o oxigênio fornecido durante esse período foi imediatamente consumido, ou seja, a demanda foi maior que o suprimento. Esse intervalo de tempo corresponde a fase exponencial de crescimento, onde o metabolismo

celular encontra-se totalmente ativado (Cereghino et al., 2002). Alguns trabalhos, como o de Salehmin e colaboradores (2013), mostram um aumento no crescimento de leveduras e bactérias quando foi adicionado perfluorocarbono, o qual aumenta a transferência de oxigênio para o meio de cultivo, além de influenciar positivamente na produção de lipases.

Tendo como objetivo manter a concentração de oxigênio dissolvido durante a fase exponencial de crescimento, foi trocado a fonte de aeração de ar comprimido (21% de oxigênio) para oxigênio puro.

A Figura 27 apresenta a curva de suprimento de oxigênio ao longo do cultivo com injeção oxigênio puro ao biorreator.

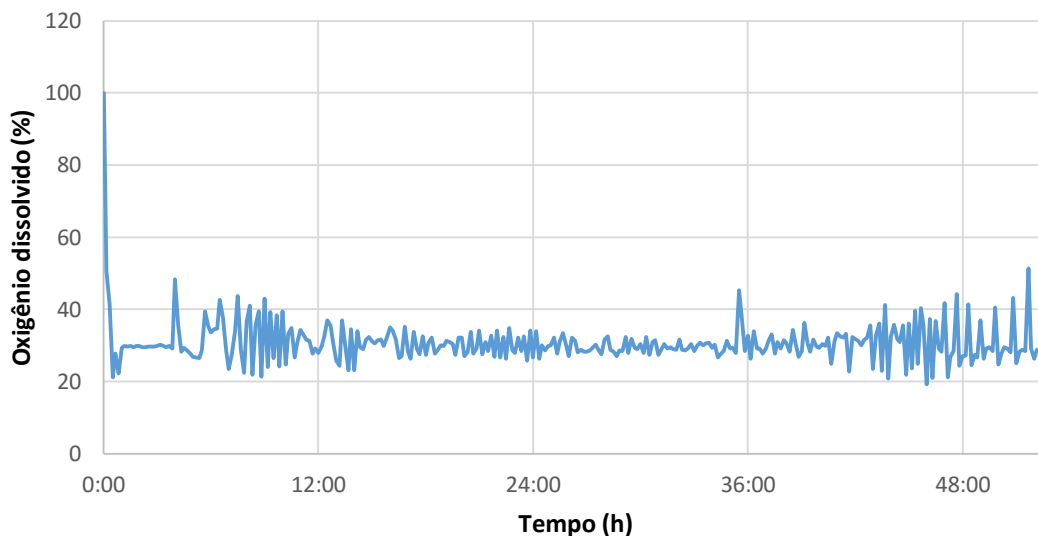


Figura 26: Padrão de oxigênio dissolvido em cultivo de *Pichia pastoris* em batelada aerada com oxigênio puro com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

É possível verificar que a troca por oxigênio puro foi capaz de manter o nível de oxigênio em 30%, como esperado, durante todo o cultivo de *P. pastoris* no biorreator.

Na Figura 28 podemos observar as cinéticas de atividade, crescimento celular e consumo de glicerol ao longo do cultivo de *P.pastoris* quando ar (A) e oxigênio

puro (B) foram usados para manter a DO em 30% e na Figura 29 a atividade, atividade específica e a produtividades com os dois tipos de aeração estão comparados.

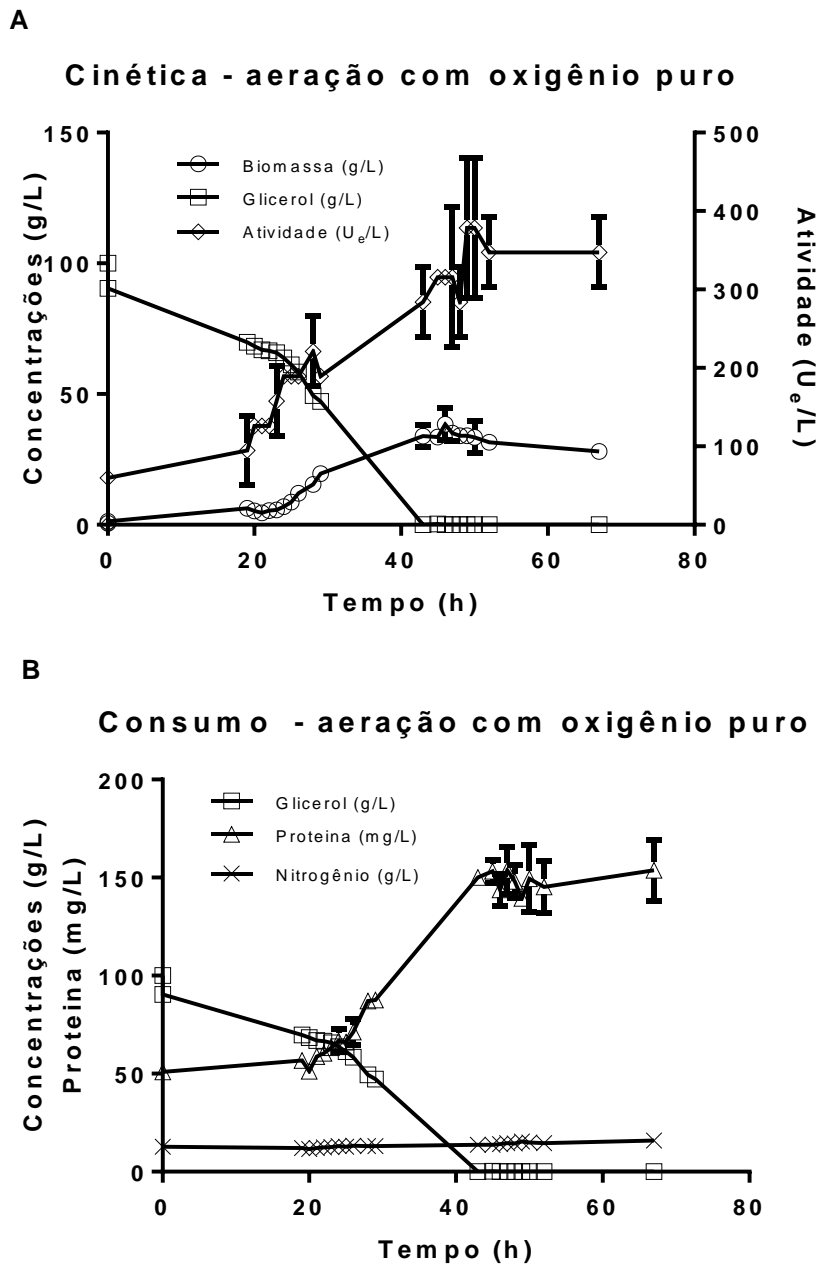


Figura 27: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira aerado com oxigênio puro a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

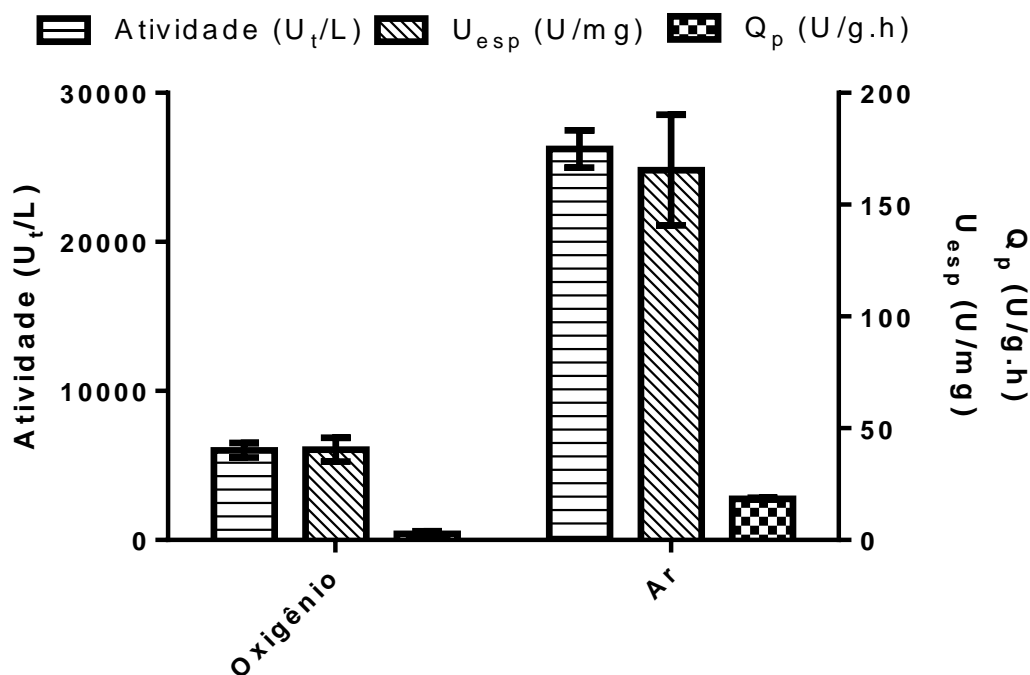


Figura 28: Parâmetros obtidos ao final do cultivo com aeração de ar comprimido e oxigênio puro em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Apesar da utilização de oxigênio puro ter sido eficiente na manutenção da DO em 30% da saturação (Figura 27), o crescimento celular, e por consequência a produção da lipase, foram prejudicados. O rendimento de célula por substrato foi de apenas 0.3 enquanto com ar comprimido chegou a 0.5. A produção de lip B e de proteínas também foi inferior (diminuição de 4,1 vezes) devido ao menor crescimento celular (diminuição de 1,6 vezes).

A possível explicação para esse resultado pode estar associada a uma maior formação de radicais livres que, em altos níveis leva a morte celular e a forte correlação entre disponibilidade de oxigênio e o metabolismo de lipídios mostrada por Baumann e colaboradores (2010), onde a biossíntese de importantes componentes de membrana é oxigênio-dependente e portanto o alto nível de oxigênio disponível desestabiliza esse balanço e prejudica o crescimento celular normal.

## 5.8. Estratégias de condução do cultivo

Na literatura o modo de condução do cultivo em modo batelada alimentada é o tipo de processo mais utilizado e estudado para produção de diversas moléculas com *Pichia pastoris* (Arnau *et al.*, 2010; Garcia-Ortega *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2006) e inclusive em escala industrial, como no trabalho de Goldrick e colaboradores (2015) para produção de penicilina.

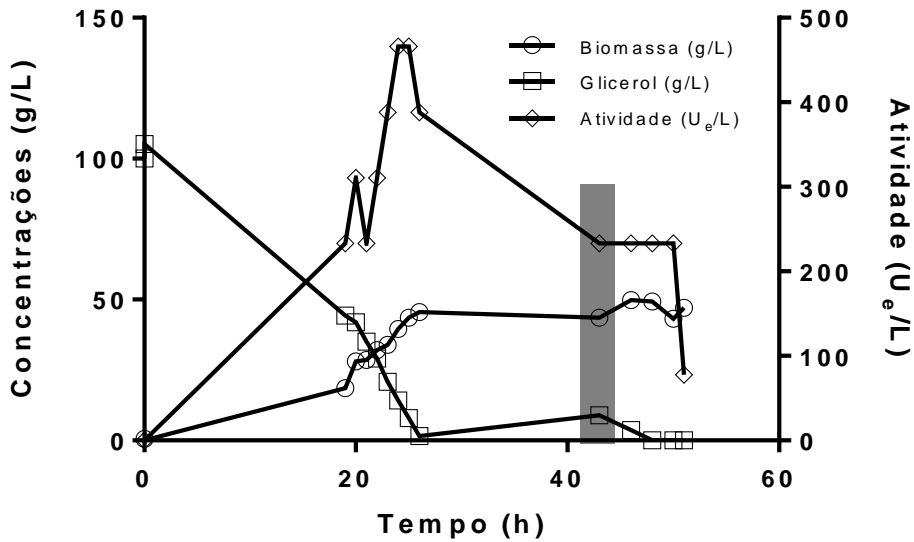
A alimentação por pulso foi escolhida para ser avaliada, visto que é mais simples de ser conduzida. Inicialmente foi estudado o tempo ideal de adição em pulso da fonte carbono durante o processo. Duas estratégias foram comparadas: alimentação com glicerina loira não esterilizada durante a fase exponencial, onde as células estão completamente adaptadas, ativas e a taxa de consumo de glicerol está em seu ápice; e alimentação com glicerina loira não esterilizada após o esgotamento da fonte de carbono, como é feito em geral, ou seja, com o metabolismo celular no estado estacionário.

A não esterilização da fonte de carbono utilizada no pulso é possível, neste processo, pois no momento da adição já há biomassa suficiente para não permitir que nenhum micro-organismo consiga competir pela fonte de carbono, além de significar uma redução no custo final do processo.

Na Figura 30 é possível observar as cinéticas de consumo de glicerina loira e produção de biomassa e enzima obtidos ao longo do cultivo de uma batelada alimentada por pulsos utilizando as duas estratégias mencionadas acima.

A

**Alimentação ao final da fase exponencial**



B

**Alimentação durante a fase exponencial**

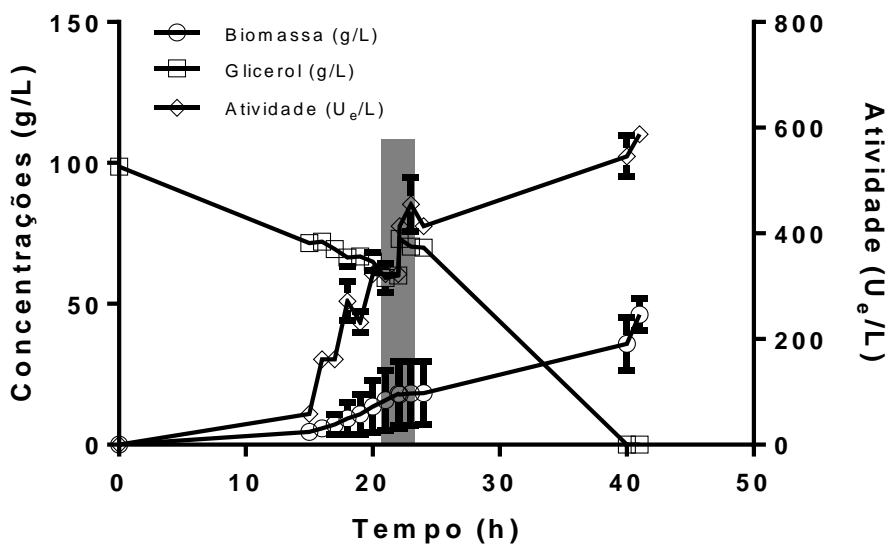


Figura 29: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. Área destacada indica o momento da alimentação. (A) Alimentação feita ao meio da fase exponencial. (B) Alimentação feita ao meio da fase exponencial.

Nos gráficos da Figura 30 estão destacados em cinza o momento em que foi feita a alimentação (para fins comparativos foi adicionado apenas 25g/L de glicerina loira), e pode-se perceber que, no primeiro caso não é visto nenhum aumento de biomassa ou atividade quando comparado a uma batelada normal, o que indica que todo o glicerol adicionado foi utilizado para manutenção celular em vez de crescimento, o que causou queda no rendimento de célula por substrato (0,45, neste caso). Já no segundo caso, o crescimento foi ligeiramente estendido, como esperado, mantendo o 0,5 de rendimento de célula por substrato, valor similar ao obtido em uma batelada convencional. Além disso, a produção de lipase também sofreu um aumento (20%) em comparação batelada convencional (Figura 22 A).

Na Figura 31 é possível observar que ao se calcular a atividade específica e a produtividade, as diferenças entre as duas estratégias ficam mais evidentes.

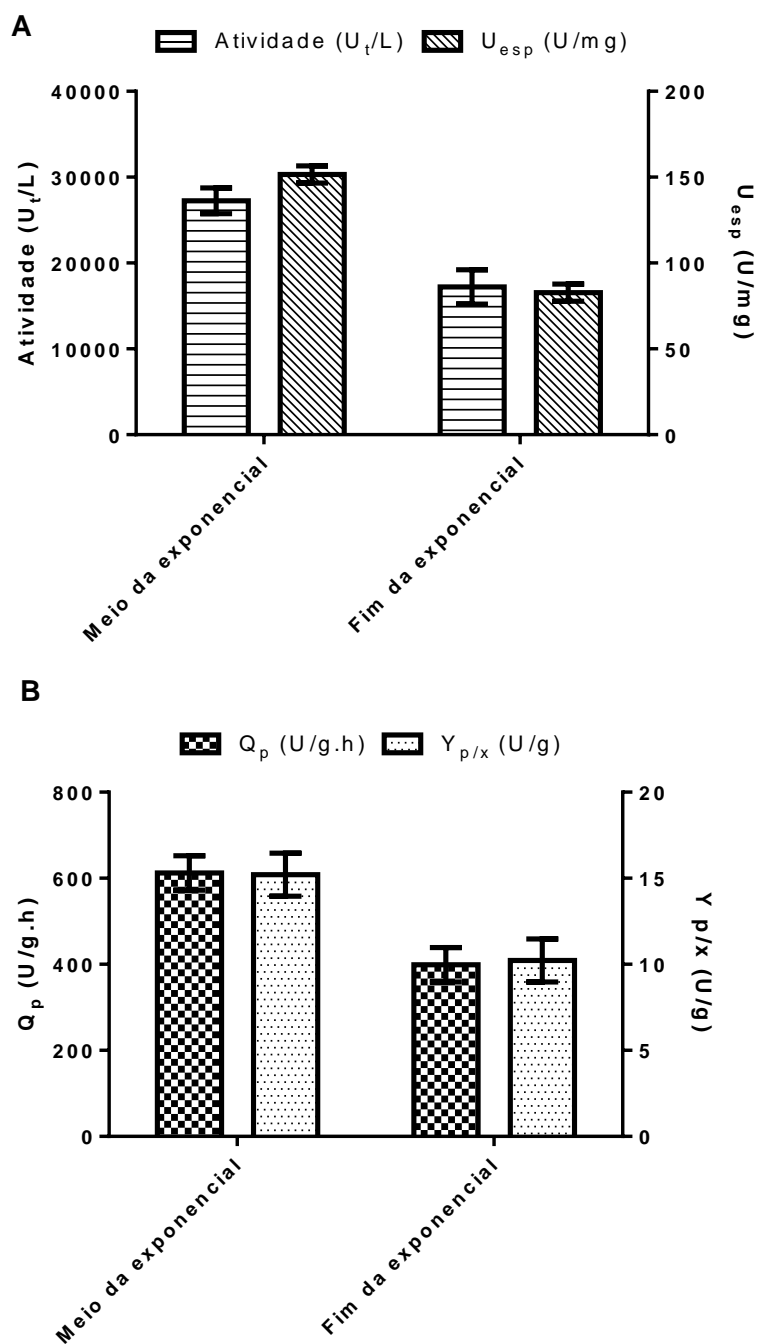


Figura 30: Parâmetros obtidos ao final do cultivo após alimentação em diferentes momentos da fase exponencial de crescimento em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.



Estes resultados parecem estar relacionados ao estresse nutricional ocasionado pela exaustão do glicerol por 16 h, quando o pulso foi introduzido ao reator. Neste tempo de cultivo (40h) a atividade enzimática já se encontrava em declínio possivelmente pela produção de proteases associada a falta nutriente e a adição de substrato não foi capaz de reverter o processo de estresse celular ocasionado pela privação da fonte de carbono, este fenômeno também foi observado por Freire e colaboradores (1997) que relacionaram a perda de atividade lipolítica em culturas de *Penicillium restrictum* com o aumento da atividade proteolítica após o esgotamento da fonte de carbono no meio.

Além da estratégia da fase de crescimento ideal para adição de substrato, a concentração da alimentação também foi estudada.

Tendo como referência a concentração máxima de glicerol que não inibe o processo (100 g/L), bateladas alimentadas com pulso de concentrações distintas foram feitas, iniciando-se com a concentração já definida e alimentando-as, durante a fase exponencial com 25, 50, 75 e 100 g/L.

A Figura 32 apresenta os parâmetros de atividade, atividade específica, produtividade e  $Y_{p/x}$  calculados em cada uma das bateladas alimentadas com as diferentes concentrações citadas acima.

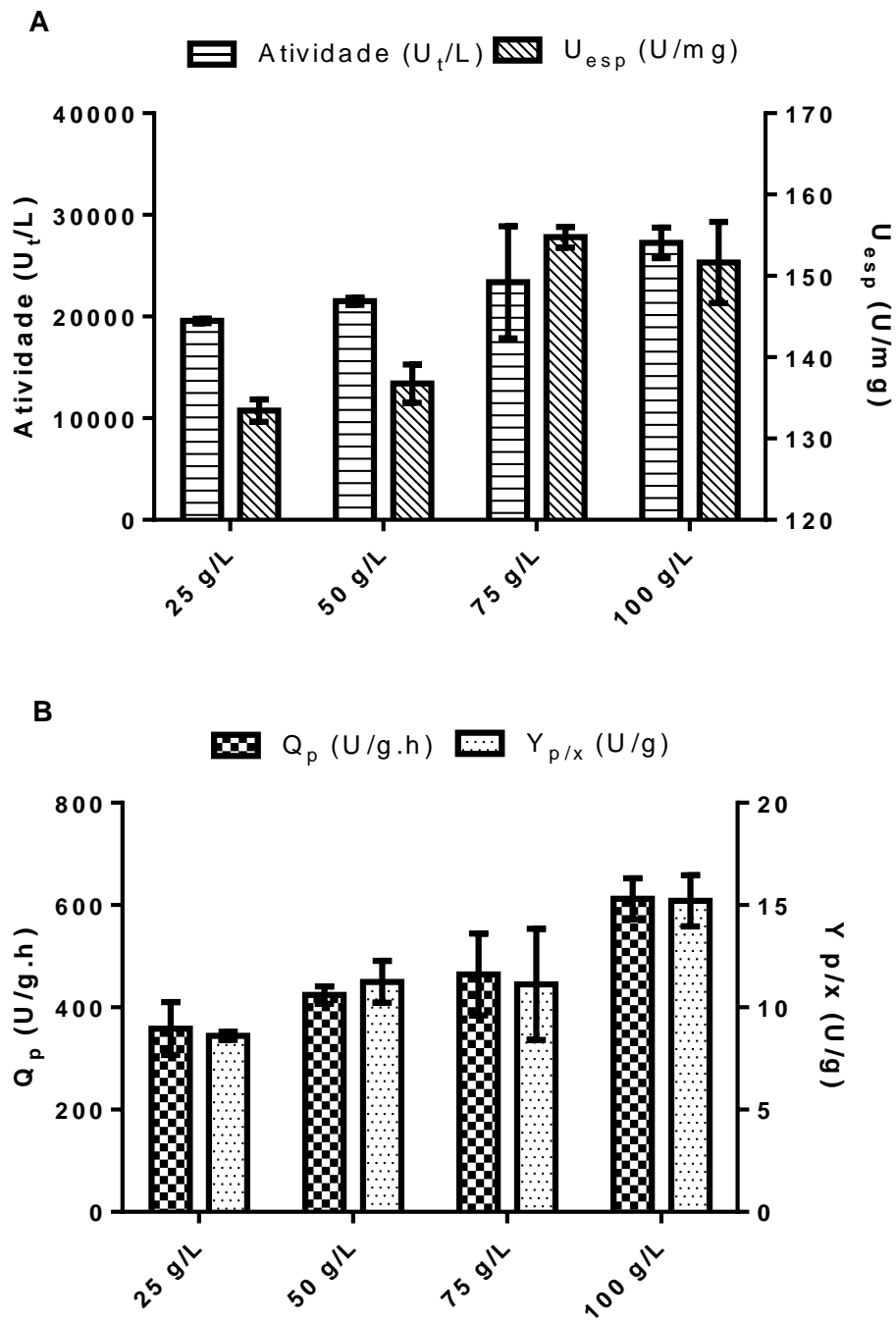


Figura 31: Parâmetros obtidos ao final do cultivo após alimentação ao meio da fase exponencial com diferentes concentrações (25, 50, 75 e 100 g/L) em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Como a lipase produzida neste caso está associada a um promotor constitutivo, ter uma maior concentração de fonte de carbono consumida ao final do processo significa uma maior concentração celular portanto, maior concentração de enzima no meio de cultivo.

Na prática o que se observou foi um ligeiro aumento em relação a atividade e atividade específica. Já em termos de produtividade essa diferença é mais explícita e é acompanhada pelo rendimento de célula por produto, sendo a alimentação de 100 g/L a que apresenta maiores produtividades.

Outra diferença significativa entre os resultados deste experimento (pulsos com 75 e 100 g/L) é que, quando a glicerina loira é alimentada na concentração de 100 g/L, a concentração final, depois da alimentação, ultrapassa a inicial e mesmo assim não ocorre o fenômeno de inibição pelo substrato, devido ao rápido consumo da glicerina loira pois o metabolismo de duplicação e respiração celular já está totalmente ativo como demonstrado em Cereghino e colaboradores (2002) e a concentração de fonte de carbono abaixa rapidamente, não causando a inibição (diferente de quando uma concentração mais alta é utilizada inicialmente e a célula ainda está em fase de adaptação).

## **5.9. Escalonamento da Produção**

Inicialmente o estudo de aumento de escala para produção de qualquer biomolécula não depende somente de uma otimização em menor escala. Normalmente, é necessário verificar a influência da geometria do biorreator e se a reologia do meio de cultivo se manterá a mesma com o aumento da escala de cultivo. Deste modo, um ensaio foi conduzido no biorreator da Infors mostrado na Figura 33 (100 L de volume útil) em meio mínimo com 100g/L de glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração com ar comprimido variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, para manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 30%, conforme as melhores condições estudadas obtidas em biorreator de bancada.

Uma consideração importante precisa ser feita sobre este ensaio, o reator utilizado está instalado no Laboratório de Bioprocessos do Programa de engenharia química da COPPE que é distante de onde os outros ensaios foram feitos e, por motivos técnicos, não foi possível fazer o pré-inóculo para este reator no mesmo local. Isto significa que o pré-inóculo foi bombeado e transportado em recipiente autoclavado de um local a outro, ficando cerca de 15 minutos sem aeração ou oxigenação.

Na Figura 34 podemos ver os padrões de oxigênio dissolvido, temperatura, pH, agitação e aeração que foram obtidos durante a cultivo em biorreator de 100L.



*Figura 32: Biorreator em escala piloto utilizado da marca infors*

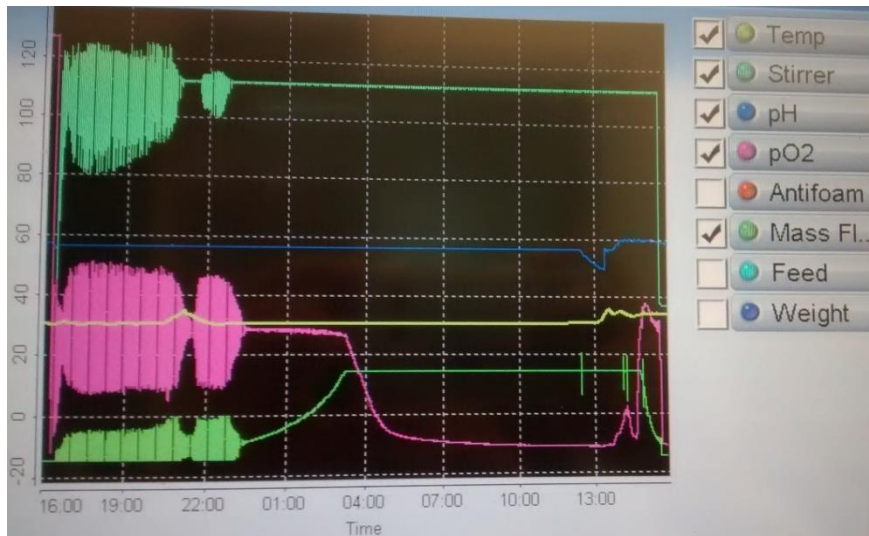


Figura 33: Acompanhamento das variáveis de processo em meio mínimo com 100g/L de glicerol a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%. (verde escuro) agitação. (azul) pH. (amarelo) temperatura. (rosa) Oxigênio dissolvido. (verde claro) aeração.

O padrão de resposta de todas as variáveis de processo foi equivalente as obtidas no reator de 5 L, como pode ser visto da Figura 34. Uma pequena oscilação do pH ocorreu ao final do processo, devido ao esgotamento da solução de hidróxido de amônio usada para o controle durante a noite. Esta oscilação de duas unidades de pH pode ter desnaturado parte das enzimas produzidas, uma vez que a estabilidade desta é baixa de pHs ácidos (Lattari, 2011).

Pequenos picos de temperatura ocorreram devido ao tempo de resposta do banho de recirculação ser lento. As demais variáveis de controle responderam satisfatoriamente a cascata definida e o consumo de oxigênio dissolvido manteve no padrão obtido em menor escala.

Na Figura 35 estão apresentadas as cinéticas de crescimento de biomassa, produção de lipase e proteína total, além do consumo de glicerol e nitrogênio.

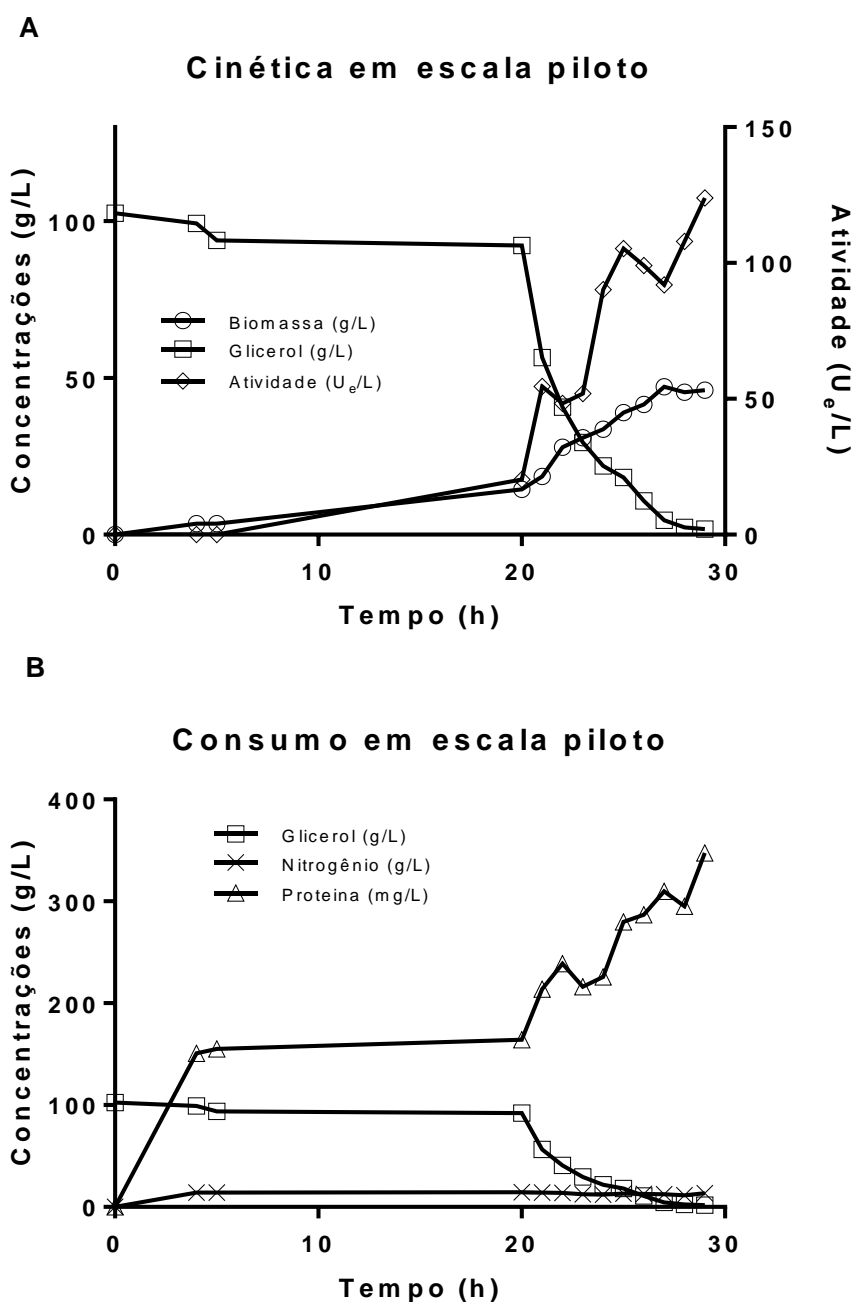


Figura 34: Acompanhamento do cultivo em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira em escala piloto a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30%.

Mesmo nas mesmas condições que os experimentos anteriores, a taxa de consumo de glicerol foi duas vezes maior que no reator de bancada mas o tempo de adaptação celular foi o mesmo (em torno de 18 h). A biomassa atingiu 49 g/L,

mantendo o  $Y_{x/s}$  em 0,5 e a produção de lipase e a de proteínas totais proporcionais e acompanhando o crescimento. O nitrogênio se manteve estável durante o tempo de fermentação, indicando que não houve restrição do crescimento devido à falta desta molécula e sua taxa de consumo se manteve a mesma que no reator de 5 L.

A Figura 36 mostra atividade, atividade específica, produtividade e rendimento de produto por célula ( $Y_{p/x}$ ) comparativamente entre bateladas em biorreator de bancada e em escala piloto.

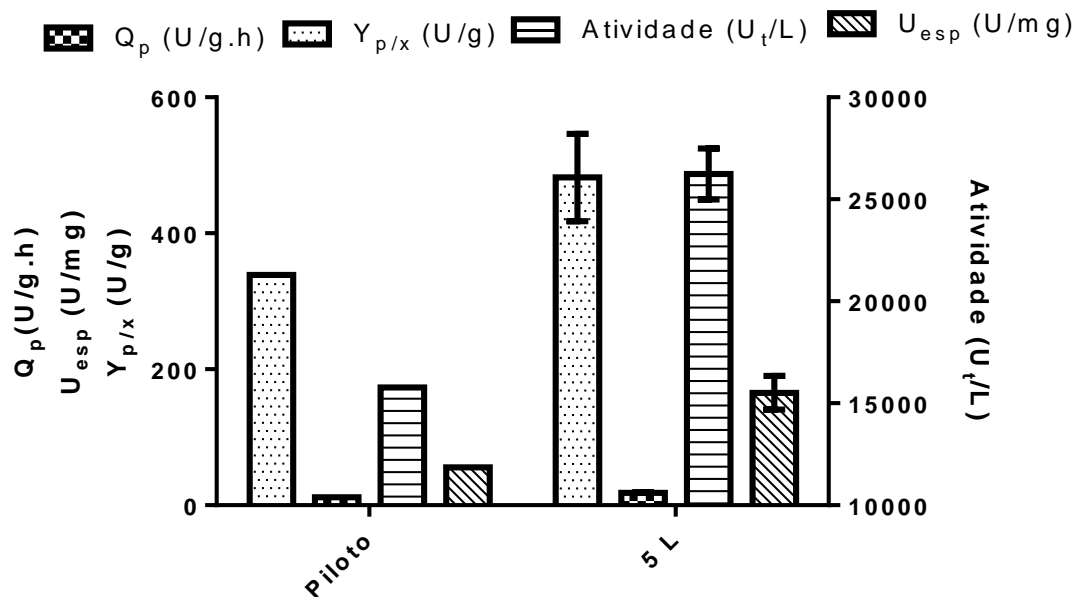


Figura 35: Parâmetros obtidos ao final do cultivo em batelada em escala piloto em meio mínimo com 100g/L de glicerina loira em escala piloto a 30°C, pH 7, agitação e aeração variando de acordo com controle em cascata entre 250-700 rpm e 0-1 vvm, respectivamente, a fim de manter a concentração de oxigênio dissolvido em 30% em comparação a uma batelada no biorreator de 5L nas mesmas condições.

Os parâmetros de fermentação obtidos em maior escala foram significativamente menores que os obtidos no biorreator de 5 L. A produtividade e a atividade diminuíram 15 e 37%, respectivamente, assim como o rendimento de produto por célula e atividade específica que foram 1,4 e 2,6 vezes menor em escala piloto. No entanto, somente uma fermentação pôde ser feita nesse sistema e o

inconveniente de transporte e do controle de temperatura citados anteriormente impossibilitaram a obtenção de condições operacionais comparativas.

## 6. Conclusão

Na Tabela 5 encontra-se resumido a diminuição do preço por litro de meio obtida ao longo deste trabalho com as respectivas produtividades obtidas em batelada a 30°C e 40g/L de fonte de carbono.

*Tabela 5: Comparação do preço por litro dos diferentes meios de cultivo utilizados ao longo do trabalho e as produtividade obtidas nas respectivas condições.*

	<b>Preço (R\$/L)</b>	<b>Produtividade (U/g.h)</b>
<b>YPD 2%</b>	51,78	9,7
<b>BSM com glicerol</b>	5,77	11,4
<b>Meio mínimo com glicerina loira</b>	1,63	12,1

Após definir o meio de cultivo com melhor custo x benefício e utilizá-lo para estudos posteriores, foi possível aumentar a produtividade de 10,0 U/g.h e atividade de 2479 U/L em um meio de cultivo rico e de alto custo e alcançar, respectivamente, 16,3 U/g.h e 28733 U/L de produtividade e atividade em um meio quimicamente definido e de menor custo. Este progresso se deu devido a verificação do desempenho de um meio mínimo de sais para o cultivo; a utilização de resíduo como fonte de carbono (glicerina loira); ao estabelecimento da concentração inicial de substrato ideal (100 g/L); a escolha da temperatura ideal de trabalho (30°C); e o uso de batelada alimentada como modo de condução de cultivo. A troca do gás de aeração também foi estudada, no entanto, não houve contribuições positivas ao aerar o biorreator com oxigênio puro.

Além disso, foi possível verificar que o aumento da escala da produção de lipase B com promotor constitutivo em *Pichia pastoris* não sofreu influências da reologia do meio, fornecendo bons resultados e, portanto, mostrando que esta produção tem potencial para futuro aumento de escala.



## 7. Perspectivas Futuras

- Conduzir batelada alimentadas em escala piloto a fim de verificar se será alcançada a mesma produtividade obtida por este modo de condução em biorreator de 5L;
- Explorar outras estratégias de alimentação como múltiplos pulsos, constante e exponencial;
- Diminuir a fase de adaptação celular através da transferência imediata do pré-inóculo em escala piloto e estratégias diferentes de alimentação, como iniciar com menor concentração de glicerol e fazer alimentação sucessivas até atingir a concentração final desejada.
- Novas modificações genéticas na cepa buscando a superexpressão da lipase B de *Candida antarctica*;
- Elaborar uma metodologia para o acompanhamento da concentração de glicerol em tempo real;
- Aplicar um controle de alimentação por feedback baseado na concentração de glicerol;
- Utilizar um sistema de mistura de gases (ar comprimido e oxigênio puro) para suplementar oxigênio durante a fase exponencial de crescimento sem que haja deficiência do crescimento devido a resposta do metabolismo oxidativo;
- Implementar um sistema de oxigenação não-dispersiva para o cultivo a fim de diminuir a formação de espuma no meio reacional e com isso evitar a necessidade da utilização de antiespumante.

## 8. Referências Bibliográficas

ADHIKARI, S.; FERNANDO, S. D.; TO, S. D. F.; BRICKA, R. M.; STEELE, P. H.; HARYANTO, A. Conversion of glycerol to hydrogen via a steam reforming process over nickel catalyts. **Energy and Fuels**, v. 22, n. 2, p. 1220–1226, 2008.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE,

M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.

ALMEIDA, I. F. M. DE. Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras. [s.l.] **Universidade técnica de lisboa**, 2009.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One biocatalyst - Many applications: The use of *Candida antarctica* lipase B - lipase in organic synthesis. **Biocat. Biotransform**, v. 16, p. 181-204, 1998.

ARECHEDERRA, R. L.; MINTEER, S. D. Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell. **Fuel Cells**, v. 9, n. 1, p. 63–69, 2009.

ARNAU, C.; RAMON, R.; CASAS, C.; VALERO, F. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 494–500, 2010.

BAUMANN, K.; CARNICER, M.; DRAGOSITS, M.; GRAF, A. B.; STADLMANN, J.; JOUHTEN, P.; MAAHEIMO, H.; GASSER, B.; ALBIOL, J.; MATTANOVICH, D.; FERRER, P. A multi-level study of recombinant *Pichia pastoris* in different oxygen conditions. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 141, 2010.

BAUMANN, K.; MAURER, M.; DRAGOSITS, M.; COS, O.; FERRER, P.; MATTANOVICH, D. Hypoxic fed-batch cultivation of *Pichia pastoris* increases specific and volumetric productivity of recombinant proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 177–183, 2008.

BCC RESEARCH. **Global Markets for Enzymes in Industrial Applications**. [s.l.: s.n.].

BEATRIZ A, ARAÚJO YJK, DE LIMA DP. Glicerol : um breve histórico e aplicação em sínteses estéreas setivas, **Química Nova**, vol. 34, nº 2, PP. 306 – 319, 2011.

BIODIESELBR. Glicerina, o tamanho do problema – Ano1, nº3 – Fev/Mar – 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; SAMPEDRO, I.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase

production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 3395-3402, 2009.

BRYJAK, J.; LIESIENE, J.; KOLARZ, B. N. Application and properties of butyl acrylate/pentaerythrite triacrylate copolymers and cellulose-based Granocel as carriers for trypsin immobilization. **Colloid Surface B:Biointerfaces**, v.61, n.1, p. 66-74, 2008.

ÇALIK, P.; ATA, Ö.; GÜNEŞ, H.; MASSAHI, A.; BOY, E.; KESKIN, A.; ÖZTÜRK, S.; ZERZE, G. H.; ÖZDAMAR, T. H. Recombinant protein production in *Pichia pastoris* under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 20–36, 2015.

CARDENAS, F., ALVAREZ, E., CASTRO-ALVAREZ, M.S., SANCHEZ-MONTERO, J.M., VALMASEDA, M., ELSON, S.W., SINISTERRA, J.V. Screening and catalytical activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **J. of Mol. Catalysis B: Enzimatic**. 14: 111-123, 2001.

CARVALHO, J. R. R. Desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de tourinhos alimentados com diferentes níveis de glicerina bruta. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Lavras**, 2011.

ÇELIK, E., ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells”, **Biotechnol. Adv.**, 30, 1108-1118, 2012.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotech**, v. 13, n. 4, p. 329–332, 2002.

CHAUHAN, A. K.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 139–145, 1999.

CHOI, D.B., PARK, E.Y. Enhanced production of mouse  $\alpha$ -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochem.**, 41, 390-397, 2006.

CORDOBA, A. YEFERSON MATURANA. **Estudo da combustão direta da glicerina bruta e loira como alternativa de aproveitamento energético sustentável**. [s.l.] Universidade de são paulo, 2011.

CREGG J.M.; VEDVICK T.S.; RASCHKE W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **BioTechnology** 11: 905–910,1993.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

DE, M. E. GOMES VIEIRA. **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. [s.l.] Universidade federal da bahia, 2011.

DRAGOSITS, M., STADLMANN, J., ALBIOL, J., BAUMANN, K., MAURER, M., GASSER, B., SAUER, M., ALTMANN, F., FERRER, P., MATTANOVICH, D. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. **J. Proteome Res.**, 8, 1380-1392, 2009.

EOM, G. T.; LEE, S. H.; SONG, B. K.; CHUNG, K.-W.; KIM, Y.-W.; SONG, J. K. High-level extracellular production and characterization of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 165–70, 2013.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of urea. **Journal of clinical pathology**, v. 13, p. 156–159, 1960.

FERNANDES, M. L. M. Produção de Lipases por Fermentação no estado sólido e sua utilização em Biocatálise. **Universidade Federal do Paraná**, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química, Curitiba, 2007.

FREIRE D. M. G., CASTILHO, L. R. Lipases em biocatálise. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, cap. 16, p.369-385, 2008.

FREIRE, D. M.; TELES, E. M.; BON, E. P.; SANT' ANNA, G. L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter : effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63-65, p. 409–421, 1997.

GARCIA-ORTEGA, X.; FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 172–181, 2013.

GAZZONI, D. L. Glicerina, biocombustíveis e bioprodutos. Disponível em: <http://www.gazzoni.eng.br/pagina42.htm>, acessado em 02/04/15.

GOLDRICK, S.; ANDREI, S.; LOVETT, D.; MONTAGUE, G.; LENNOX, B. The development of an industrial-scale fed-batch fermentation simulation. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 70–82, 2015.

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.

GOODRICK, J. C.; XU, M.; FINNEGAN, R.; SCHILLING, B. M.; SCHIAVI, S.; HOPPE, H.; WAN, N. C. High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 74, n. 6, p. 492–497, 2001.

GOTOR-FERNÁNDEZ V.; BUSTO E.; GOTOR V. *Candida antarctica* lipase B: an ideal bio-catalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. **Adv SynthCatal** 348:797–812, 2006.

GRUPO FREEDONIA. **WORLD ENZYME DEMAND**. [s.l: s.n.].

GUMEL A.M.; ANNUAR M.S.M.; HEIDELBERG T.; CHISTI Y. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochem** 46:2079–90, 2011.

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

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. **Acta Biotechnology**, v.11, p. 159-167, 1991.

HARMSSEN, J. **Industrial Process Scale-Up A Practical Innovation Guide from Idea to Commercial Implementation**. Amsterdam: Elsevier B.V., 2013.

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

HISS, H. **Cinética de fermentações**. 1ª edição, São Paulo, 2013.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550–563, 2012.

INAN, M., CHIRUVOLU, V., ESKRIDGE, K.M., VLASUK, G.P., DICKERSON, K., BROWN, S. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb. Tech.**, 24, 438-445, 1999.

International Energy Agency (IEA), em Medium-term Oil & Gas Markets 2010. **International Energy Agency**, Paris, pp. 91–99, 2010.

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

JAHIC, M.; ROTTICCI-MULDER, J.; MARTINELLE, M.; HULT, K.; ENFORS, S.-O. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 6, p. 385–393, 2002.

JAHIC, M.; WALLBERG, F.; BOLLOK, M.; GARCIA, P.; ENFORS, S.-O. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial cell factories**, v. 2, p. 6, 2003.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S. Y.; ZHENG, S. P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 108–114, 2012.

JOSEPH, B., RAMTEKE, P.W., THOMAS, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. **Biotechnol. Adv.** 26, 457–470, 2008.

KIM, S. J.; SONG, J. K.; KIM, H. K. Cell surface display of *Staphylococcus haemolyticus* L62 lipase in *Escherichia coli* and its application as a whole cell biocatalyst for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 97, p. 54–61, 2013a.

KIM, S.; WARBURTON, S.; BOLDOGH, I.; SVENSSON, C.; PON, L.; D'ANJOU, M.; STADHEIM, T. A.; CHOI, B. K. Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 174–181, 2013b.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. **Organic Process Research and Development**, v. 6, n. 4, p. 446–451, 2002.

KOTTMEIER, K.; GÜNTHER, T. J.; WEBER, J.; KURTZ, S.; OSTERMANN, K.; RÖDEL, G.; BLEY, T. Constitutive expression of hydrophobin HFB1 from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and its pre-purification by foam separation during cultivation. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 2, p. 162–170, 2012.

KRUG, L.; PAPPEN, F. G.; ZIMERMANN, F. C.; DEZEN, D.; RAUBER, L. P.;

SEMMELMANN, C.; ROMAN, L. I.; BARRETA, M. H. **Conservação de Peças Anatômicas com Glicerina Loira** Concórdio - SC: 2011

LAGE, J. F. **Glicerina bruta oriunda da agroindústria do biodiesel na alimentação de cordeiros em terminação**. [s.l.] Universidade federal de viçosa, 2009.

LAGER, T., **Startup of new plants and process technology in the process industries: organizing for an extreme event**. 2012.

LARSEN, A. C. Co-digestão anaeróbia de glicerina bruta e efluente de fecularia. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - **Universidade Estadual do Oeste do Paraná** - UNIOESTE - Campus de Cascavel – PR – Área de Concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Cascavel, PR, 2009.

LATTARI, F. S. Produção e caracterização de lipase B de Candida antarctica expressa em Pichia pastoris. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2011.

LEE, K.; FOGLIA, T.A.; CHANG, K. Production of alkyl ester as biodiesel from gractionated lard and restaurant grease. **JAOCs**, v.79, p. 191-195, 2002.

LI, L.; JI, F.; WANG, J.; LI, Y.; BAO Y. Esterification degree of fructose laurate exerted by Candida antarctica lipase B in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology** 69, 46–53, 2015.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHIMIDELL, W. Produção de Enzimas Microbianas. **Biotecnologia Industrial**: volume 2 e 4; 1ª edição. São Paulo, 2001.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MACEDO, I.C. e NOGUEIRA, L.A.H., Biocombustíveis, Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, **Cadernos NAE**, Brasília, Brasil, 235p, 2005.

MACHADO, A.C.O. Produção e separação de intermediários quirais catalisadas por lipases em reatores assistidos por membranas. Tese de doutorado, Coppe, **Universidade federal do rio de janeiro**, 2011.

MANGAS-SÁNCHEZ, J.; SERRANO-ARNALDOS, M.; ADLERCREUTZ, P. Effective

and highly selective lipase-mediated synthesis of 2-monoolein and 1,2-diolein in a two-phase system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 112, p. 9–14, 2015.

MANOEL, E A; PAIS, K C; FLORES, M C; MIRANDA, L S M; COELHO, M A Z; SIMAS, A B C; Freire, D. M.G.; SOUZA, R O M A. Kinetic resolution of a precursor for myo-inositol phosphates under continuous flow conditions. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**,(Print) v. 87, p. 139-143, 2013.

MARTINELLE M, HOLMQUIST M, HULT K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab.** 1258:272–6, 1995.

MAURER, M.; KÜHLEITNER, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 37, 2006.

MELO, E. G. V. Avaliação do glicerol bruto na estimulação de bactérias hidrocarbono clásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos”. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, **Universidade Federal da Bahia**, 2010.

MERROW, E.W. Industrial Megaprojects, Concepts, Strategies, and Practices for Success. **John Wiley and Sons**, New York, NY, 2011.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. DA; LIMA, V. M. G. DE; GIESE, C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MICHIYO M. Purification of a thermostable, nonspecific lipase from *Candida* and its use in transesterification. **WO Patent 8802775**; 1986.

MINJIE, G.; ZHONGPING, S. Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic *pichia pastoris*. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 216–226, 2013.

NASCIMENTO, U.M. Montagem e Implantação de Usina Piloto de Baixo Custo para Produção de Biodiesel, **1º Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**, Brasília, Brasil, pp. 147-150, 2006.



NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica Lehninger Lehninger. 4 edição, **Sarvier**, São Paulo, 2006.

NOSEDA, D. G.; BLASCO, M.; RECÚPERO, M.; GALVAGNO, M. Á. Bioprocess and downstream optimization of recombinant bovine chymosin B in *Pichia* (*Komagataella*) *pastoris* under methanol-inducible AOXI promoter. **Protein Expression and Purification**, v. 104, p. 85–91, 2014.

PAQUES F. W., MACEDO G.A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PARENTE, E. J. S. Biodiesel: uma aventura tecnológica num país engraçado. **1 ed. Fortaleza: Tecbio**, 68 p, 2003.

PELICANO, H.; MARTIN, D.S.; XU, R-H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, 25, 4633–4646, 2006.

PEREIRA, C. D. A. Produção de Metabólitos Voláteis Frutais por *Kluyveromyces Marxianus* em Fermentação Submersa em meio à base de melado de Soja. **Universidade Federal do Paraná**, Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Curitiba, 2007.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.

QIN, X.; QIAN, J.; YAO, G.; ZHUANG, Y.; ZHANG, S.; CHU, J. GAP promoter library for fine-tuning of gene expression in *Pichia pastoris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3600–3608, 2011.

QUISPE, C. A G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475–493, 2013.

Resolução nº 06, de 16 de setembro de 2009. Estabelece em cinco por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, de acordo com o disposto no art. 2º da Lei no 11.097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Seção 1, p. 99, 2009.

ROBRA, S. Uso da glicerina bruta em biodigestão anaeróbica: aspectos tecnológicos, ambientais e ecológicos. 120f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente). **Universidade Estadual de Santa Cruz**, Ilhéus, 2006.

ROBY, M. H.; ALLOUCHE, A.; DAHDOU, L.; DE CASTRO, V. C.; ALVES DA SILVA, P. H.; TARGINO, B. N.; HUGUET, M.; PARIS, C.; CHRÉTIEN, F.; GUÉANT, R.-M.; DESOBRY, S.; OSTER, T.; HUMEAU, C. Enzymatic production of bioactive docosahexaenoic acid phenolic ester. **Food Chemistry**, v. 171, p. 397–404, 2015.

SABOURIN-PROVOST, G.; HALLENBECK, P. C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3513–3517, 2009.

SALEHMIN, M. N. I.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. High cell density fed-batch fermentations for lipase production: Feeding strategies and oxygen transfer. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1527–1543, 2013.

SANTOS, A. F. Novas perspectivas da glicerina-Síntese de novos nitratos com propriedades farmacológicas e melhoradores de cetano. Disponível EM: <[http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde\\_busca/arquivo.php?codArquivo=879](http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=879)> Acesso em: dez.2014.

SANTOS, J. S., DORS, G., OLIVEIRA, D., & MONTE BLANCO, S. F. M. Glicerólise de óleo de peixe catalisada por lipase comercial de *Rhizomucor miehei* em meio com surfactante de grau alimentício. **Quím. Nova**, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Volume 2. Ed. **Edgard Blücher LTDA**, São Paulo, Cap. 8-12, 2001.

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

SIMAS, A. B. C.; SILVA, A. A. T. DA; CUNHA, A. G.; ASSUMPÇÃO, R. S.; HOELZ, L. V. B.; NEVES, B. C.; GALVÃO, T. C.; ALMEIDA, R. V.; ALBUQUERQUE, M. G.; FREIRE, D. M. G.; DE ALENCASTRO, R. B. Kinetic resolution of (±)-1,2-O-isopropylidene-3,6-di-O-benzyl-myo-inositol by lipases: An experimental and theoretical study on the reaction of a key precursor of chiral inositols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 1-2, p. 32–40, 2011.

SIRÉN, N.; WEEGAR, J.; DAHLBACKA, J.; KALKKINEN, N.; FAGERVIK, K.; LEISOLA, M.; VON WEYMARN, N. Production of recombinant HIV-1 Nef (negative factor) protein

using *Pichia pastoris* and a low-temperature fed-batch strategy. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 44, n. Pt 3, p. 151–158, 2006.

STADLMAYR, G.; MECKLENBRÄUKER, A.; ROTHMÜLLER, M.; MAURER, M.; SAUER, M.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 4, p. 519–529, 2010.

STELMACHWSKI, M. Utilization of glycerol, a by-product of the transesterification process of vegetable oils: A review. **Ecological Chemistry and Engineering S**, 18 (1), pp. 9-30, 2011.

SURRIBAS, A.; STAHN, R.; MONTESINOS, J. L.; ENFORS, S. O.; VALERO, F.; JAHIC, M. Production of a *Rhizopus oryzae* lipase from *Pichia pastoris* using alternative operational strategies. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 3, p. 291–299, 2007.

TABACCO, A.; MEIATTINI, F.; MODA, E.; TARLI, P. Simplified Enzymic / Colorimetric Serum Urea Nitrogen Determination Thymol Is a Suitable Preservative for Uric Acid Standards in the Uricase Technique CHEMISTRY , in the CK-BB Least-Squares Evaluation of Linearity More on the Detection of Serum CK-BB Acti. **Clinical chemistry**, v. 25, n. 2, p. 4–5, 1979.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. Enzymatic biodiesel production of microalgae lipids under supercritical carbon dioxide: Process optimization and integration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 103–113, 2014.

UPPENBERG, J., ÖHRNER, N., NORIN, M., HULT, K., KLEYWEGT, G.J., PATKAR, S., WAAGEN, V., ANTHONSEN, T., and JONES, T.A. Crystallographic and molecular-modelling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry** 34, 16838–16851, 1995.

VADHANA, A. K. P.; SAMUEL, P.; BERIN, R. M.; KRISHNA, J.; KAMATCHI, K.; MEENAKSHISUNDARAM, S. Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 3, p. 177–183, 2013.

VASCONCELOS Y. Glicerina. **Revista Fapesp**, 2012. Disponível em <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2012/06/14/residuos-bem-vindos/>>. Acessado em Set. 2013.

WANG, X.; SUN, Y.; KE, F.; ZHAO, H.; LIU, T.; XU, L.; LIU, Y.; YAN, Y. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter.

**Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1355–1367, 2012.

WANG, Y.; HSIEH, Y. L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. **J.Membrane Science**, v. 309, P. 73-81, 2008.

WATERHAM, H.R.; DIGAN, M.E.; KOUTZ, P.J.; LAIR, S.V.; CREGG, J.M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene** 186:37–44, 1997.

WEGNER, G. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. **FEMS Microbiol Rev** 7: 279–283, 1990.

XIAO, A.F., ZHOU, X.S., ZHOU, L., ZHANG, Y.X. Improvement of cell viability and hirudin production by ascorbic acid in *Pichia pastoris* fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 72, 837–844, 2006.

YU, X.L. Pharmaceutical quality by design: product and process development, understanding, and control. **Pharm. Res.** 25, 781–791, 2008.

ZHANG, A. L.; LUO, J. X.; ZHANG, T. Y.; PAN, Y. W.; TAN, Y. H.; FU, C. Y.; TU, F. Z. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1611–1619, 2009.

ZHANG, W.; INAN, M.; MEAGHER, M. M. Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 389, n. 1, p. 43–64, 2007.

ZHAO, W.; WANG, J.; DENG, R.; WANG, X. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 189–195, 2008.

ZHU, T., YOU, L., GONG, F., XIE, M., XUE, Y., LI, Y., MA, Y. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline  $\beta$ -mannose in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology** 49 (4), 407–412, 2011.