

JULIANE VICENTINO FERREIRA DA SILVA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE
DE ENZIMAS FÚNGICAS**

Araraquara

2013

JULIANE VICENTINO FERREIRA DA SILVA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DE ENZIMAS FÚNGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e incentivo nos momentos difíceis, por dar força e clareza na execução das atividades propostas e por não me deixar desistir com as adversidades.

À minha família por estar ao meu lado em todos os momentos, por me fortalecer com todo amor e palavras de conforto, por motivar e alegrar, por mostrar e transformar as dificuldades em pequenos obstáculos superados.

À Prof^a. Dr^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, pelo acompanhamento, incentivo e dedicação no desenvolvimento do projeto.

À aluna de doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Geisiany Maria de Queiroz, por toda dedicação, atenção e a preocupação em ensinar e contribuir na conclusão desse projeto.

Ao Rodrigo Sorrechia, suporte técnico do laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, por toda ajuda e amizade dedicadas ao longo de todo esse tempo.

À todos que de alguma forma contribuíram para realização desse projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Micro-organismos utilizados em Biotecnologia.....	11
1.1.1. <i>Aspergillus niger</i>	12
1.1.2. <i>Trichoderma reesei</i>	13
1.2. Enzimas.....	14
1.2.1. Lipase.....	14
1.2.2. β -glucanase.....	15
1.3. Determinação de parâmetros cinéticos.....	15
1.3.1. Temperatura.....	16
1.3.2. pH.....	16
1.3.3. Íons.....	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Micro-organismos.....	19
3.2. Produção das enzimas em agitador orbital.....	19
3.3. Produção das enzimas em biorreator.....	20
3.4. Meios para a produção de lipase.....	20
3.5. Meios para a produção de β -glucanase.....	21
3.6. Separação e recuperação das enzimas.....	22
3.7. Determinação de proteínas por Bradford.....	22
3.8. Determinação da atividade das enzimas.....	23
3.8.1. Determinação da atividade de lipase.....	24

3.8.2. Determinação da atividade de β -glucanase.....	24
3.9. Precipitação por fracionamento com sulfato de amônio.....	25
3.10. Avaliação dos parâmetros cinéticos.....	26
3.10.1. pH.....	26
3.10.2. Temperatura.....	27
3.10.3. Íons.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Produção das enzimas nos diferentes meios em agitador orbital..	29
4.1.1. Lipase.....	29
4.1.2. β -glucanase.....	31
4.2. Produção de β -glucanase em biorreator.....	35
4.3. Determinação de proteínas totais para as amostras liofilizadas....	35
4.4. Parâmetros Cinéticos.....	36
4.1.1. Lipase.....	36
4.1.1.1. pH.....	36
4.1.1.2. Temperatura.....	38
4.1.1.3. Íons.....	39
4.1.2. β -glucanase.....	42
4.1.2.1. pH.....	42
4.1.2.2. Temperatura.....	44
4.1.2.3. Íons.....	46
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

RESUMO

As enzimas estão presentes em todas as células vivas, onde exercem a função de catalisadores das reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do

metabolismo celular. Esses biocatalisadores são moléculas de proteínas e seu poder catalítico está associado à conformação nativa, que depende de condições específicas de pH, temperatura e força iônica do meio. Os micro-organismos são bastante atrativos para a indústria, pois possibilitam a produção de enzimas por processos fermentativos em larga escala com regularidade necessária e simplicidade na requisição nutricional. Assim, embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais são, em sua maior parte, obtidas a partir de micro-organismos. Este trabalho teve como objetivo a produção das enzimas lipase e β -glucanase a partir dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, respectivamente, em diferentes meios de cultura, para determinar as condições de maior produção da enzima em questão. As enzimas produzidas em agitador orbital foram obtidas a partir da filtração do produto da fermentação, precipitação com sulfato de amônio e liofilização. Após a produção e precipitação a atividade das enzimas e a concentração de proteínas foram quantificadas, os parâmetros cinéticos foram determinados frente a diferentes pHs, temperaturas e força iônica do meio. A lipase apresentou melhor atividade a 30°C e em pH 6,0. A presença dos íons Mg^{2+} e Zn^{2+} levaram a um aumento na atividade da enzima. A β -glucanase apresentou maiores atividades quando submetidas a 37°C e pH 5,0. Os íons Mg^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} induziram melhor a atividade enzimática.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Aspergillus niger* (linhagem industrial).

Figura 2. *Trichoderma reesei* (RUT C 30).

Figura 3. Curva de Calibração de soro albumina bovina (BSA).

Figura 4. Pesos úmidos e secos das biomassas dos três meios empregados na produção de lipase em agitador orbital.

Figura 5. Atividades específicas de lipase obtidas nos meios A, B e C.

Figura 6. Pesos úmidos e secos das biomassas dos três meios empregados na produção de β -glucanase em agitador orbital.

Figura 7. Atividades específicas de β -glucanase obtidas nos meios A, B e C.

Figura 8. Avaliação do efeito de pH na atividade específica de lipase.

Figura 9. Avaliação do efeito de temperatura na atividade específica de lipase.

Figura 10. Avaliação do efeito da presença de íons na atividade específica de lipase.

Figura 11. Avaliação do efeito de pH na atividade específica de β -glucanase.

Figura 12. Avaliação do efeito de Temperatura na atividade específica de β -glucanase.

Figura 13. Avaliação do efeito da presença de íons na atividade específica de β -glucanase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios utilizados para a produção de lipase (g/L).

Tabela 2. Meios utilizados para a produção de β -glucanase (g/L).

Tabela 3. Massa utilizada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) para a precipitação de cada um dos meios produzidos em agitador orbital e biorreator para lipase e β -glucanase.

Tabela 4. Volumes (mL), Pesos úmidos, Pesos secos (g) e a média das triplicatas de lipase.

Tabela 5. Média das triplicatas da dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de lipase.

Tabela 6. Volumes (mL), Pesos úmidos, Pesos secos (g) e a média das triplicatas de β -glucanase.

Tabela 7. Média das triplicatas da dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de β -glucanase.

Tabela 8. Dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de β -glucanase produzida em biorreator.

Tabela 9. Proteínas totais das enzimas liofilizadas.

Tabela 10. Atividade da lipase em diferentes pH nos diferentes meios de crescimento.

Tabela 11. Atividade específica de lipase em diferentes pH nos diferentes meios de crescimento.

Tabela 12. Dosagem e atividade de lipase em diferentes temperaturas.

Tabela 13. Atividade específica de lipase em diferentes temperaturas.

Tabela 14. Atividade de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Tabela 15. Atividade específica de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Tabela 16. Porcentagem de inibição da atividade de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Tabela 17. Atividade de β -glucanase em diferentes pH (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

Tabela 18. Atividade de β -glucanase em diferentes pH (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

Tabela 19. Atividade específica de β -glucanase em diferentes pH em diferentes meios.

Tabela 20. Atividade de β -glucanase em diferentes temperaturas. (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

Tabela 21. Atividade de β -glucanase em diferentes temperaturas (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

Tabela 22. Atividade específica de β -glucanase em diferentes temperaturas em diferentes meios.

Tabela 23. Atividade de β -glucanase na presença de diferentes íons (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

Tabela 24. Atividade de β -glucanase na presença de diferentes íons (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

Tabela 25. Atividade específica de β -glucanase presença de diferentes íons em diferentes meios.

Tabela 26. Porcentagem de inibição da atividade de β -glucanase presença de diferentes íons em diferentes meios.

1. INTRODUÇÃO

O uso de micro-organismos como bactérias e fungos tem sido amplamente explorado na pesquisa e na indústria devido a sua capacidade de produzir enzimas. Essas, por sua vez, são potenciais biocatalisadores principalmente por sua quimioseletividade, regioseletividade, estereoseletividade, por serem biodegradáveis e produzidas por fontes naturais renováveis (JAEGER; EGGERT, 2002). É em tal cenário que a biotecnologia está inserida, melhorando as técnicas de fermentação, obtenção e purificação de enzimas com vasta aplicação industrial e comercial.

Para tanto, são necessários uma série de conhecimentos como qual o melhor sistema biológico a ser utilizado, se há necessidade do uso de modificações genéticas, o que pode aperfeiçoar a produção, além do emprego de indutores eficientes. Técnicas de manipulação, cultivo e seleção de células, assim como melhorias dos processos de fermentação e reações enzimáticas são fundamentais para otimizar a aplicação biotecnológica, que hoje abrange vários ramos das indústrias farmacêutica, detergentes, têxtil, aplicações médicas como ferramentas de diagnóstico, cosméticos, papel e celulose, entre outros (ZHU et al; 2011).

A fermentação é o método mais amplamente utilizado na biotecnologia com diferentes tipos de cultivo, submerso ou em estado sólido (TREICHEL et al; 2009). Agitadores orbitais possuem controle de temperatura e agitação, porém o volume para a produção enzimática é reduzido. Os biorreatores são equipamentos dotados de mecanismos que controlam a temperatura do meio, o pH, a agitação e a aeração do meio, além da possibilidade de maiores volumes de produção.

A produção de diferentes enzimas por bactérias, fungos e leveduras é definida a partir da composição do meio empregado, a cepa do micro-organismo, as condições de cultivo, temperatura, pH, densidade do inóculo, tempo da fermentação

e os tipos de fonte de nitrogênio e carbono (TREICHEL et al; 2009). Tais fatores influenciam na produção enzimática, assim como diferentes espécies de fungos e bactérias tem capacidades adversas de produzir uma mesma enzima. Sendo assim, alterações nesses fatores podem influenciar induzindo ou inibindo a produção enzimática. Por isso, é de extrema importância a identificação de cepas potenciais produtoras das enzimas desejadas assim como as melhores condições para a indução da produção.

A quantificação da atividade da enzima produzida, além dos fatores descritos acima, depende fundamentalmente também do substrato utilizado no processo de dosagem enzimática e das concentrações deles, sendo que altas concentrações podem inibir a atividade da enzima (SUZUKI et al; 2001) além da especificidade desta enzima pelo substrato.

Atualmente, são conhecidas cerca de 4000 enzimas e 200 dentre essas são utilizadas comercialmente (SHARMA et al; 2001).

1.1. Micro-organismos utilizados em Biotecnologia

Micro-organismos são capazes de produzir e secretar enzimas, como as lipases e β -glucanases, especialmente fungos, pois normalmente as enzimas produzidas por eles são extracelulares (CARVALHO, 2005) e a potência com que tal produção ocorre pode ser influenciada por vários fatores, dentre eles o meio de cultivo ao qual os micro-organismos são expostos e os componentes dele, as condições ambientais do crescimento como a temperatura, o pH, a aeração, a agitação e o tempo a que são expostos (CIHANGIR; SARIKAYA, 2004).

Inúmeros micro-organismos são empregados para a produção de diversas enzimas e a análise dos principais fatores que influenciam positivamente no

rendimento reacional a fim de obter as melhores condições para o uso destas, traz importantes dados que favorecem a aplicação de enzimas em diversas áreas. São exemplos de micro-organismos de uso frequente na biotecnologia, bactérias como: *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Serratia* sp.; fungos filamentosos como: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp.; e leveduras como: *Candida* sp., *Saccharomyces* sp., *Trichosporon* sp e *Rhodotorula* sp (TREICHEL et al; 2009).

Os fungos são os micro-organismos de maior interesse biotecnológico atualmente (SILVA et al; 2008). São micro-organismos eucarióticos heterotróficos filamentosos e reproduzem-se sexuada ou assexuadamente com produção de esporos (LIMA, 1975).

1.1.1. *Aspergillus niger*

São fungos saprófitos, caracterizados por apresentar cabeças conidiais escuras, normalmente negras e conidióforos hialinos a marrom, com cabeças globosas (ABARCA et al; 1994). Formam colônias marrons com aspecto em rachaduras (Figura 1) e estão presentes em materiais de decaimento de plantas. É um dos gêneros de fungos mais largamente utilizados na biotecnologia (MAYORDOMO et al; 2000).



Figura 1. *Aspergillus niger* (linhagem industrial).

Fonte: arquivo próprio

1.1.2. *Trichoderma reesei*

São fungos filamentosos, mesófilos que habitam o solo (SAMUELS, 1996). Possui hifas septadas, ramificadas, polinucleadas que formam colônias brancas, que crescem rapidamente, e, posteriormente, verdes pela esporulação (Figura 2) (GAMS, et al; 1998).

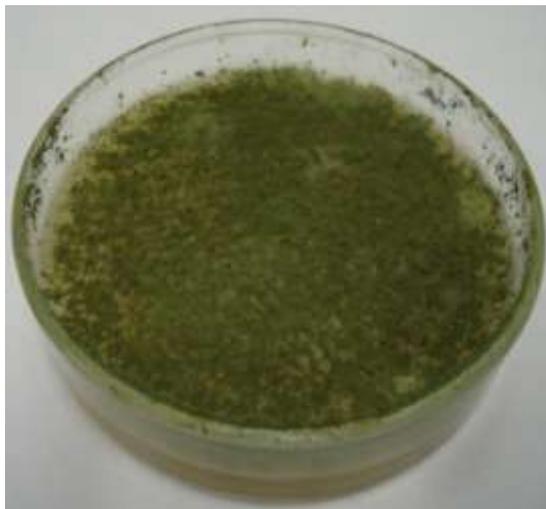


Figura 2. *Trichoderma reesei* (RUT C 30).

Fonte: arquivo próprio.

1.2. Enzimas

Algumas enzimas já estão consolidadas no mercado pela facilidade na sua obtenção. São altamente específicas em transformações químicas, por isso são amplamente utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica, em cosméticos, detergentes e sínteses orgânicas. Enzimas derivadas de micro-organismos são mais frequentemente utilizadas devido à grande variedade de atividades catalíticas já avaliadas e por serem mais estáveis que as derivadas de animais e plantas (HASAN et al; 2005).

1.2.1. Lipase

Lipases são carboxilesterases que catalisam hidrólises e sínteses de longas cadeias de acilgliceróis, obtendo glicerol e ácidos graxos livres, assim como transesterificações e hidrólises de outros ésteres (SHARMA et al; 2001).

As lipases utilizadas são geralmente as microbianas, produzidas extracelularmente e catalisam diversas reações, sendo aplicadas na indústria oleoquímica, em processos farmacêuticos, na síntese de biosurfactantes e principalmente em detergentes (SAISUBRAMANIAN et al; 2006).

A aplicação de lipases em detergentes exige que essas enzimas sejam termoestáveis e consigam atuar em pH alcalino (SAISUBRAMANIAN et al; 2006), por isso muitos estudos envolvendo testes de estabilidade com enzimas são realizados.

Como em qualquer produção de enzimas, os fatores como pH, temperatura do meio, componentes, oxigênio dissolvido, fontes de nitrogênio e carbono são de extrema importância (SHARMA et al; 2001). No caso de lipases, fontes de carbono

lipídicas são essenciais para a obtenção de altos níveis de rendimento na produção (TREICHEL et al; 2009).

1.2.2. β -glucanase

O uso de β -glucanases nas aplicações biotecnológicas é uma alternativa interessante pois não são específicas a um único substrato (BAUERMEISTER, 2010) e sua ação hidrolítica sobre diversas substâncias naturais tem demonstrado vasto potencial na aplicação industrial (GIESE et al; 2003).

São hidrolases específicas de polissacarídeos, denominadas polissacaridases, que hidrolisam ligações β -D-glicosídicas, produzindo glicose como produto. Podem estar localizadas ligadas à parede celular como no citoplasma (GIESE et al; 2003).

Sua produção é regulada negativamente pela repressão dos genes que a codificam na presença de glicose e positivamente na presença de outras fonte de carbono. (NORONHA et al; 2000). Em alguns micro-organismos a concentração e natureza da fonte de carbono facilmente fermentáveis ou glicose inibem a produção da enzima (GIESE et al; 2003).

As β -glucanases podem ser aplicadas no controle biológico de patógenos de algumas plantas, como aditivos em rações animais, na obtenção de bioativos, na melhoria de características de vinhos entre outros (BAUERMEISTER et al; 2010).

1.3. Determinação de parâmetros cinéticos

A importância das enzimas na indústria tem aumentado significativamente. Isso porque a busca por políticas ambientais que substituam os processos químicos convencionais pelas empresas tem tomado maior espaço no desenvolvimento de novas metodologias e produtos.

1.3.1. Temperatura

A temperatura é um aspecto muito importante para a atividade enzimática. Altas temperaturas podem levar à desnaturação da enzima, o que acarreta inativação da mesma e, conseqüentemente, a não obtenção dos resultados desejados com seu uso, assim como em baixas temperaturas. Dentro de certos limites, a velocidade de uma reação enzimática aumenta com o aumento da temperatura.

Entretanto, a partir de uma determinada temperatura, a velocidade da reação diminui bruscamente. O aumento de temperatura provoca maior agitação das moléculas e, portanto, maiores possibilidades de elas se chocarem para reagir. Porém, se for ultrapassada certa temperatura, a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem e ela se desnatura (NELSON; COX, 2011).

Para cada tipo de enzima existe uma temperatura ótima, na qual a velocidade da reação é máxima, permitindo o maior número possível de colisões moleculares sem desnaturá-la (NELSON; COX, 2011).

1.3.2. pH

O pH (potencial hidrogeniônico), também é determinante para a atividade de uma enzima. Cada enzima tem um pH ótimo de atuação, no qual a sua atividade é máxima. Valores menores de pH, ou seja, mais ácidos, podem levar à desnaturação enzimática, assim como valores mais altos, ou seja, mais alcalinos. O pH ótimo para a maioria das enzimas fica entre 6 e 8, mas há exceções, uma vez que a concentração dos íons H^+ pode influenciar na ligação das enzimas e seus substratos devido a repulsão de cargas ou afetar resíduos dos sítios catalíticos, que podem ser

ionizados, influenciando na eficácia da reação e no resultado esperado do processo (NELSON; COX, 2011).

1.3.3. Íons

A presença de diferentes íons em uma mistura reacional enzima-substrato pode influenciar positivamente ou negativamente na eficiência de tal ligação, podendo o íon funcionar como inibidor da ligação, diminuindo a atividade enzimática, ou como ativador da ligação, aumentando a atividade enzimática. Tal fato, pode ocorrer, pois os íons podem levar a desnaturação da enzima se afetarem sua estrutura espacial. Entretanto, também pode ocorrer o aumento da atividade enzimática na presença de um determinado íon, pois este pode agir como indutor da enzima agindo como uma espécie de cofator que auxilia na ligação com o substrato, o que aumenta a atividade enzimática (NELSON; COX, 2011).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Esse trabalho teve por objetivo geral produzir, fracionar e avaliar a estabilidade quanto a temperatura, ao pH e a presença de íons das enzimas lipase e β -glucanase obtidas a partir dos fungos *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, respectivamente.

2.2. Objetivos Específicos

- Produzir lipase e β -glucanase fúngicas em agitador orbital;
- Avaliar a eficiência de produção dessas enzimas empregando diferentes meios de crescimento;
- Fracionar as enzimas;
- Determinar as atividades específicas;
- Analisar alterações dos parâmetros cinéticos enzimáticos devido a influência do pH, temperatura e íons sobre a atividade de cada uma das enzimas produzidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Micro-organismos

Inicialmente foi preparado o meio de cultura em placas e tubos para o repique de produção e manutenção dos fungos. Os meios utilizados foram: Potato Dextrose Agar (PDA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Após o repique, as placas e tubos semeados foram mantidos em estufa a 28°C durante um período de 7 a 10 dias. Os meios sempre foram previamente esterilizados.

Os fungos foram mantidos em repiques quinzenais e a obtenção do inóculo realizada para a concentração final de 10^7 células/mL ocorreu através de raspagem das placas repicadas com posterior contagem em câmara de Neubauer.

A produção em maior escala, realizada em biorreator, exige a manutenção das condições de produção diferentes para ambos os fungos. Para o fungo *Aspergillus niger*, produtor de lipase, a fermentação foi mantida a uma temperatura de 28°C, 1,5 vvm/L de aeração, 200 rpm de agitação com pH 6,5 por 7 dias. Para o fungo *Trichoderma reesei*, produtor de β -glucanase, a temperatura mantida foi de 30°C, 0,5 vvm/L de aeração, agitação de 150 rpm, pH 5,0 por 4 dias.

3.2. Produção das enzimas em agitador orbital

Foram testados 3 meios diferentes de cultivo para cada uma das enzimas, lipase e β -glucanase, em agitador orbital inicialmente, objetivando-se a escolha do meio de maior produção enzimática para a produção desse em biorreator.

3.3. Produção das enzimas em biorreator

Para a produção em biorreator (TECNAL, Tec-Bio-V) foi utilizado o meio que apresentou maior produção enzimática em agitador orbital da enzima β -glucanase.

3.4. Meios para a produção de lipase

Abaixo a tabela 1 demonstra a composição dos 3 meios utilizados para a produção de lipase.

Tabela 1. Meios utilizados para a produção de lipase (g/L).

Componentes	Meio A	Meio B	Meio C
NaNO₃	0,500	0,005	0,010
MgSO₄	0,500	-	-
MgSO₄ . 7 H₂O	-	0,005	0,005
KCl	0,500	0,005	-
K₂HPO₄	2,000	-	-
KH₂PO₄	-	0,020	0,010
Glicose	2,000	0,100	-
Extrato de levedura	0,500	0,010	0,500
Óleo de oliva	10,00	0,100	0,200
Extrato de malte	3,000	-	-
Peptona	5,000	-	0,200
Bacto peptona	-	0,050	-

O cultivo de *A. niger* nos três meios descritos anteriormente ocorreu em erlenmeyers de 200 mL, submetidos a 28°C, com agitação de 200 rpm e incubados por 7 dias com inóculo de 10^7 células/mL.

O meio de cultura A utilizado foi o descrito por Mahadik et al. (2004), o meio de cultura B foi descrito por Mhetras et al. (2010) e o meio de cultura C utilizado foi descrito por Silva et al. (2008). As produções foram realizadas em triplicata.

3.5. Meios para a produção de β -glucanase

Abaixo a tabela 2 demonstra a composição dos 3 meios utilizados para a produção de β -glucanase.

Tabela 2. Meios utilizados para a produção de β -glucanase (g/L).

Componentes	Meio A	Meio B	Meio C
NH₄NO₃	1,000	-	-
(NH₄)₂SO₄	-	1,500	-
NaNO₃	-	1,500	3,000
FeSO₄ . 7 H₂O	0,002	-	-
FeSO₄	-	-	0,010
MgSO₄	-	-	0,500
MgSO₄ . 7 H₂O	0,200	0,500	-
KCl	0,200	-	0,500
K₂HPO₄	0,900	-	1,000
ZnSO₄	0,002	-	-
KH₂PO₄	-	1,000	-
MnSO₄	0,002	-	-
Sacarose	-	-	30,00
Farelo de trigo	-	40,00	-

O cultivo de *T. reesei* nos três meios a seguir ocorreu em erlenmeyers de 200 mL, submetidos a 30°C, com agitação de 150 rpm e incubados por 4 dias com inoculo de 10⁷ células/mL.

O meio de cultura A utilizado foi descrito por El- Katatny et al. (2000), o meio de cultura B foi descrito por Kilminskaya et al. (2001) e o meio de cultura C utilizado foi o Czapek Dox Broth. As produções foram realizadas em triplicata.

3.6. Separação e recuperação das enzimas

Após o período de incubação, o material obtido da fermentação enzimática foi submetido ao processo de filtração a vácuo utilizando filtros de 0,45 μm . A biomassa obtida foi pesada imediatamente, como massa úmida. Após foi submetida a secagem até estabilidade do peso a 50°C.

3.7. Determinação de proteínas por Bradford

A quantificação de proteínas foi realizada no produto da fermentação, após filtração, a partir do método baseado na absorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 proposto por Bradford (BRADFORD, 1976). Para a preparação da reação, misturou-se 1,5 mL do Reagente Bradford, adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich) a com 50 μL do extrato enzimático.

Deixou-se a mistura em temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, leu-se em espectrofotômetro a 595 nm.

Foram realizadas curvas padrões a cada determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de soro albumina bovino (BSA). Na figura 3 está representado um exemplo de uma das curvas realizadas utilizando BSA como solução padrão nas concentrações entre 0 e 250 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a equação da reta foi utilizada para o cálculo da concentração total de proteínas em mg/mL .

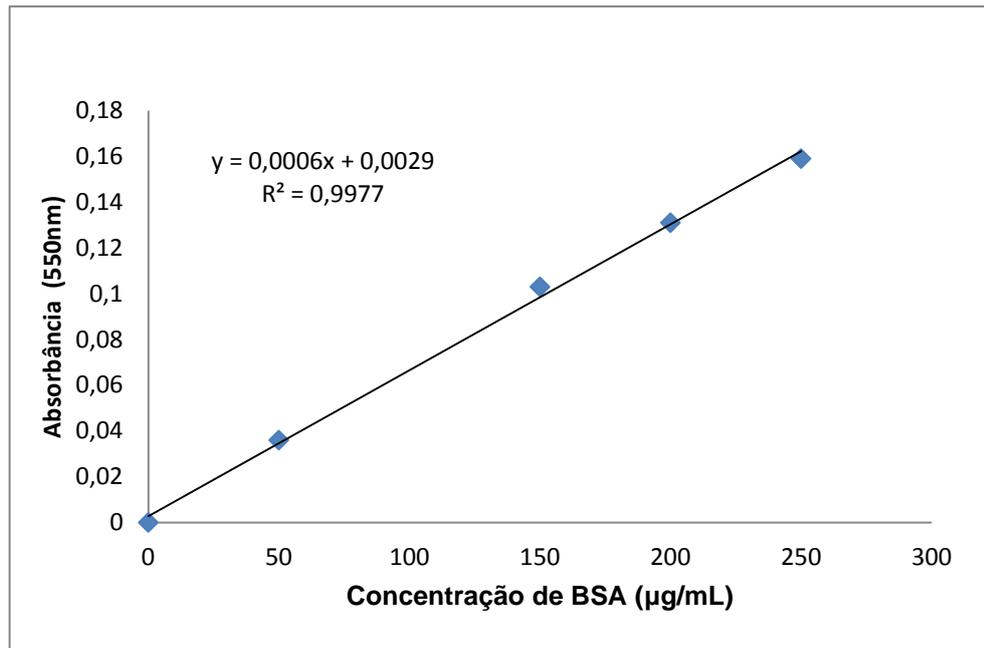


Figura 3. Curva de calibração de soro albumina bovina (BSA).

3.8. Determinação da atividade das enzimas

Após a filtração para a separação do meio fermentado da massa micelial, realizou-se a constatação da presença das enzimas desejadas através de reações enzimáticas. A quantificação de *p*-nitrofenol indicou a presença da lipase no extrato fermentado, enquanto que, a quantificação da glicose mostrou a síntese da β -glucanase. Para a reação de dosagem de lipase foram utilizadas curvas com o padrão *p*-nitrofenol e para a reação de dosagem de β -glucanase o padrão glicose.

3.8.1. Determinação da atividade de lipase

A quantificação de lipase realizada foi realizada segundo Mayordomo et al. (2000), com algumas modificações. O substrato utilizado foi o *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP). Primeiramente preparou-se os reagentes, sendo que para o reagente A foram pesados 20 mg de Triton X-100 e 5 mg de goma arábica, adicionando-se 5 mL de tampão fostato 50 mM, pH 6,5. Para o reagente B pesou-se 1,5 mg *p*NPP e

adicionou-se 1 mL de álcool isopropílico. Obteve-se o reagente C misturando-se 405 μL do Reagente A e 45 μL do Reagente B.

Para a quantificação adicionou-se 50 μL da amostra enzimática com 450 μL de reagente C e incubou-se a mistura por 5 minutos a 40°C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 500 μL de Trizma base 2%. Para o branco foram colocados 450 μL de reagente C e 50 μL de enzima previamente desnaturada por fervura 10 minutos. As soluções foram então submetidas à centrifugação de 14000 rpm, a 5 °C por 3 minutos e leu-se a densidade ótica do sobrenadante a 410 nm.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto de reação, sendo definida como U/min/mL, conforme as condições descritas.

3.8.2. Determinação da atividade de β -glucanase

A determinação de β -glucanase foi realizada segundo MARCO e FELIX (2007) com algumas modificações, usando laminarina 1% em tampão acetato 50 mM, pH 5,0. A reação seguiu-se com a adição de 125 μL da amostra e 250 μL de laminarina 1% (em tampão acetato 50 mM pH 5,0). Incubou-se as soluções a 37°C por 30 minutos e a reação foi parada com a adição de 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Ao branco foi adicionado 125 μL de enzima previamente desnaturada por fervura 10 minutos. Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos com consequente adição de 5 mL de água para posterior leitura do produto da reação, o açúcar reduzido, a 550 nm em espectrofotômetro.

Uma unidade da atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto de reação, sendo definida como U/min/mL, conforme as condições descritas.

3.9. Precipitação por fracionamento com sulfato de amônio

Após a filtração do produto da fermentação e das dosagens, foi realizado a precipitação por fracionamento salino, utilizando sulfato de amônio sólido, segundo a tabela de DAWSON et al. (1969). O sulfato de amônio foi adicionado lentamente até atingir o índice de saturação desejado, sob agitação e refrigeração. A porcentagem utilizada para a lipase foi de 80% (CARVALHO et al; 2005) e para a β -glucanase de 60% (MARCO e FELIX, 2007). Após tal procedimento, a solução foi deixada em repouso, *overnight*, em geladeira. Realizou-se a centrifugação da solução e a 10000 rpm, 4°C por 20 minutos.

O precipitado enzimático resultante foi ressuspenso em seu respectivo tampão e realizou-se a diálise das enzimas, sob refrigeração e agitação por 24 horas, contra tampão, trocada até remoção do sulfato de amônio. O extrato clarificado obtido foi congelado e, posteriormente, liofilizado.

Para a realização dos testes de estabilidade, o produto da fermentação das três amostras (triplicatas) de cada um dos meios produzidos em agitador orbital (A, B e C) foram mesclados, sendo o *pool* resultante filtrado a vácuo, precipitado com sulfato de amônio, centrifugados, congelados e liofilizados, resultando nas amostras de enzimas a serem ressuspendidas para a realização dos testes. Os volumes dos *pools* e as massas utilizadas para a precipitação com o sal estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Massa utilizada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g) para a precipitação de cada um dos meios produzidos em agitador orbital e biorreator para lipase e β -glucanase.

Meio	Lipase	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	β -glucanase	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)
	(mL)	80%	(mL)	60%
A	259	133,65	279	107,97
B	263	135,71	276	106,81
C	275	141,90	280	108,36
Biorreator	-	-	2900	1.122,30

3.10. Avaliação dos parâmetros cinéticos

Para todos os testes de estabilidade, foram pesados 10 mg das amostras liofilizadas de lipase e β -glucanase e ressuspensas em 1 mL de tampão. Para algumas amostras foram necessárias a realização de diluições antes da determinação da densidade ótica obtida na quantificação da atividade enzimática.

3.10.1. pH

Foram definidos diferentes tampões e pH utilizados para a análise da influencia do pH na atividade enzimática.

As reações realizadas seguiram os mesmos procedimentos descritos acima nos itens 3.8.1., para determinação da atividade de lipase, e 3.8.2., para a determinação da atividade de β -glucanase. Para lipase os tampões utilizados foram: acetato 50 mM, pH 4,0; 5,0; 6,0; fosfato 50 mM pH 6,5; 7,0; 8,0. Para a β -glucanase os tampões utilizados foram: acetato 50 mM, pH 4,0; 5,0; 6,0; fosfato 50 mM pH 7,0; 8,0.

3.10.2. Temperatura

Diferentes temperaturas foram empregadas para a análise da sua influência na atividade enzimática. Para lipase foram testadas as temperaturas: 30°C, 40°C, 50°C e 60°C. Para a β -glucanase foram testadas as temperaturas: 30°C, 37°C, 40°C, 50°C e 60°C.

As reações realizadas seguiram os mesmos procedimentos descritos acima nos itens 3.8.1., para determinação da atividade de lipase, e 3.8.2., para a determinação da atividade de β -glucanase.

3.10.3. Íons

Diferentes íons foram analisados quanto a sua influência na atividade enzimática: Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} .

Para as reações com a presença dos íons, as metodologias foram adaptadas de forma que a presença de cada íon exercesse influencia na atividade enzimática. Ambas enzimas foram primeiramente dosadas sem a presença de nenhum dos íons, denominado controle da reação, sendo a atividade específica encontrada tomada como 100% e a comparação das atividades específicas obtidas após a adição de cada um dos íons foi realizada com a porcentagem representativa desses resultados.

Para a reação de lipase, na preparação do reagente A1 pesou-se 40 mg de Triton X-100 e 10 mg de goma arábica, adicionando-se 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5. Para o reagente A2 pesou-se a massa referente de cada substância para que a solução final do ensaio tivesse concentração de 1 mM em 2,5 mL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5, sendo a concentração inicial pesada de 10 mM. O reagente B foi preparado pesando-se 1,5 mg pNPP e adicionou-se 1 mL de álcool

isopropílico e o reagente C foi preparado misturando-se 202,5 µL do reagente A1, 202,5 µL do reagente A2 e 45 µL do reagente B.

Para a quantificação da atividade enzimática adicionou-se 50 µL da amostra enzimática com 450 µL de reagente C e incubou-se a mistura por 5 minutos a 40°C. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 500 µL de Trizma base 2%. As soluções foram então submetidas a centrifugação de 14000 rpm, a 5 °C por 3 minutos e leu-se a densidade ótica do sobrenadante a 410 nm.

A reação de β-glucanase foi preparada com 125 µL da amostra enzimática, 125 µL laminarina 2% (em tampão acetato 50 mM pH 5,0) e 125 µL solução iônica 3 mM (em tampão acetato 50 mM pH 5,0) de cada um dos íons testados. Pesou-se a massa referente de cada substância para que a solução final do ensaio apresentasse concentração de 1 mM em 125 µL de tampão acetato 50 mM pH 5,0, sendo a concentração inicial pesada de 3 mM. Incubou-se as soluções a 37°C por 30 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 1,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, as soluções foram incubadas em água fervente por 5 minutos com consequente adição de 5 mL de água para posterior leitura em espectrofotômetro do açúcar reduzido a 550 nm.

4. RESULTADOS

4.1. Produção das enzimas nos diferentes meios em agitador orbital

4.1.1. Lipase

Os meios de produção foram submetidos à filtração a vácuo e os volumes, biomassa úmida e seca obtidos estão descritos na tabela 4, assim como a porcentagem de perda por secagem de cada uma das amostras, também representados graficamente na figura 4. O peso úmido obtido com o meio A é cerca de 16 vezes maior que o obtido em B e 21 vezes maior que o C, porém a porcentagem de perda maior foi registrada para as biomassas dos meios B e C, com cerca de 81% de perda.

Tabela 4. Volumes (mL), Pesos úmidos, Pesos secos (g) e a média das triplicatas de lipase.

Meio	Volume	Peso Úmido	Peso Seco	% Perda Por Secagem
A1	185	5,90	1,99	66,3
A2	195	4,85	1,91	60,6
A3	193	4,13	1,76	57,4
Média	191	4,96	1,89	61,4
B1	185	0,08	0,02	75,0
B2	185	0,58	0,08	86,2
B3	175	0,25	0,04	84,0
Média	182	0,30	0,05	81,7
C1	190	0,03	0,01	66,7
C2	183	0,61	0,06	90,2
C3	180	0,06	0,01	83,3
Média	184	0,23	0,03	80,1

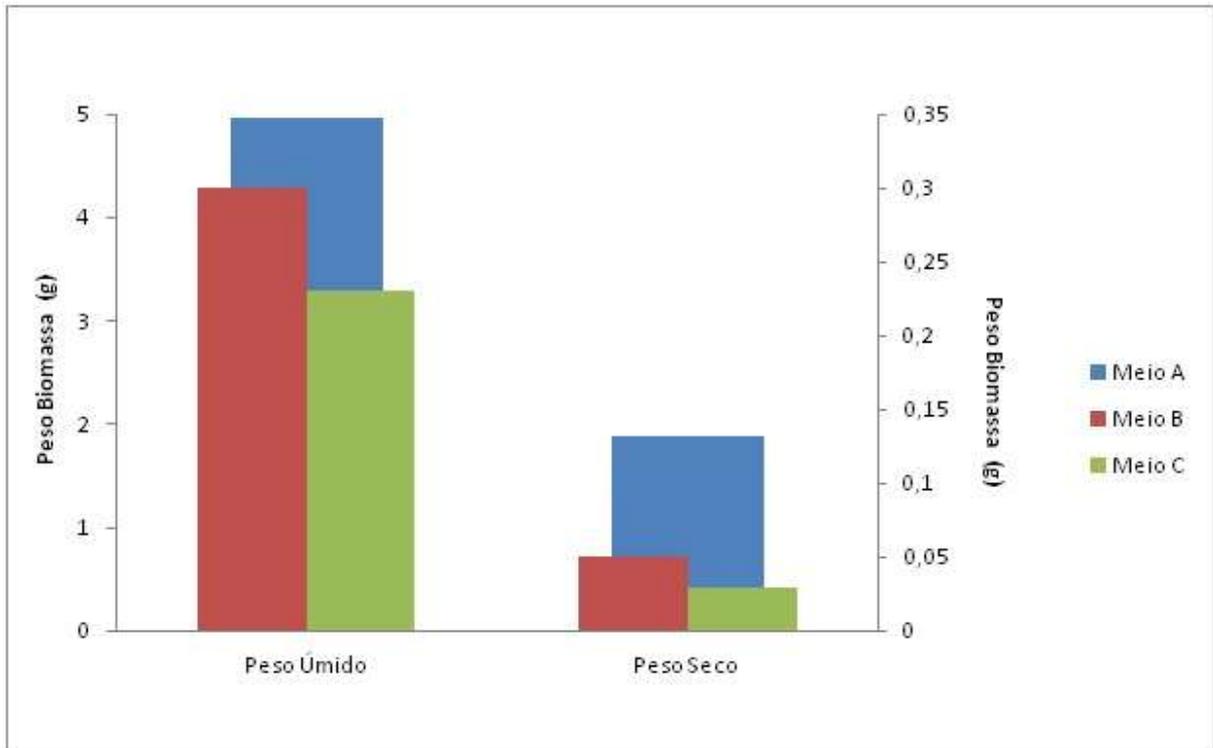


Figura 4. Pesos úmidos e secos das biomassas dos três meios empregados na produção de lipase em agitador orbital.

Foram realizadas as dosagens de proteínas totais e enzima lipase para todas as amostras e os valores obtidos no espectrofotômetro estão descritos na tabela 5 e representados graficamente na figura 5. O meio A apresentou maior produção de proteínas totais, seguido dos meios C e B, assim como a de lipase. Entretanto, ao relacionar ambos os resultados para a obtenção da atividade específica verificou-se que o meio C induziu maior produção de lipase pelo fungo *A. niger*, seguido dos meios B e A.

Tabela 5. Média das triplicatas da dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de lipase.

Meio	Abs (595 nm)	Proteínas Totais (mg/mL)	Abs (410 nm)	Atividade Enzimática (U/min/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Média					
Meio A	0,334	0,488	0,487	170,31	348,99
Média					
Meio B	0,053	0,086	0,358	55,08	635,99
Média					
Meio C	0,056	0,091	0,436	67,08	737,93

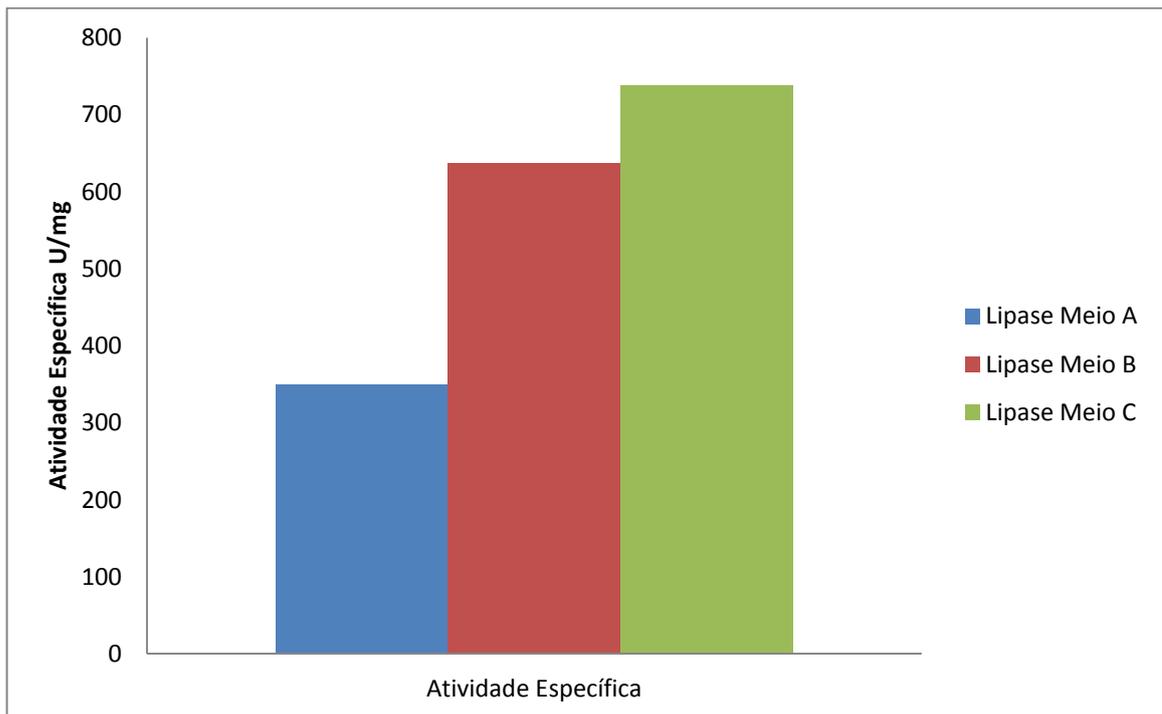


Figura 5. Atividades específicas de lipase obtidas nos meios A, B e C.

4.1.2. β -glucanase

Os meios de produção foram submetidos à filtração à vácuo e os volumes, biomassa úmida e seca obtidos estão descritos na tabela 6, assim como a

porcentagem de perda por secagem de cada uma das amostras de β -glucanase, também representadas na figura 6. O peso úmido obtido com o meio B é cerca de 8 vezes maior que o obtido em A e C, porém a porcentagem de perda maior foi registrada para as biomassas dos meios A, com 63%, e C, com cerca de 58% de perda.

Tabela 6. Volumes (mL), Pesos úmidos, Pesos secos (g) e a média das triplicatas de β -glucanase.

Meio	Volume	Peso Úmido	Peso Seco	% Perda Por Secagem
A1	175	1,50	0,83	66,3
A2	166	0,89	0,40	55,1
A3	190	2,55	0,82	67,8
Média	177	1,65	0,68	63,1
B1	160	13,32	8,53	36,0
B2	170	15,51	9,58	38,2
B3	174	14,29	8,38	41,4
Média	168	14,37	8,83	38,5
C1	195	1,56	0,52	66,7
C2	195	2,00	0,89	55,5
C3	190	1,68	0,81	51,8
Média	193	1,75	0,74	58,0

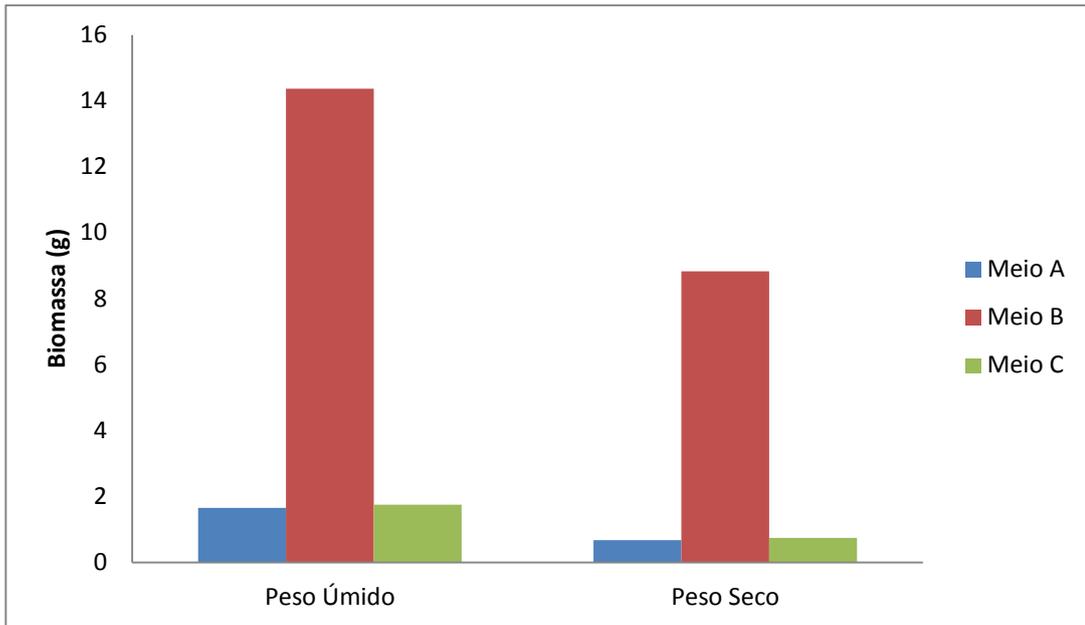


Figura 6. Pesos úmidos e secos das biomassas dos três meios empregados na produção de β -glucanase em agitador orbital.

Foram realizadas as dosagens de proteínas totais e enzima β -glucanase para todas as amostras e os valores obtidos no espectrofotômetro estão descritos na tabela 7 e representados graficamente na figura 7. O meio A apresentou maior produção de proteínas totais, seguido dos meios B e C, porém, para a produção de β -glucanase, o meio B induziu a maior produção que A e C. Entretanto, ao relacionar ambos resultados para a obtenção da atividade específica de cada meio verificou-se que o meio C produz relativamente mais β -glucanase em meio a produção total de proteínas, seguido dos meios B e A.

Tabela 7. Média das triplicatas da dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de β -glucanase.

Meio	Abs (595 nm)	Proteínas Totais (mg/mL)	Abs (540 nm)	Atividade Enzimática (U/min/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Média Meio A	0,566	0,690	0,169	8,57	12,38
Média Meio B	0,410	0,680	0,271	13,75	20,26
Média Meio C	0,036	0,270	0,162	8,22	30,21

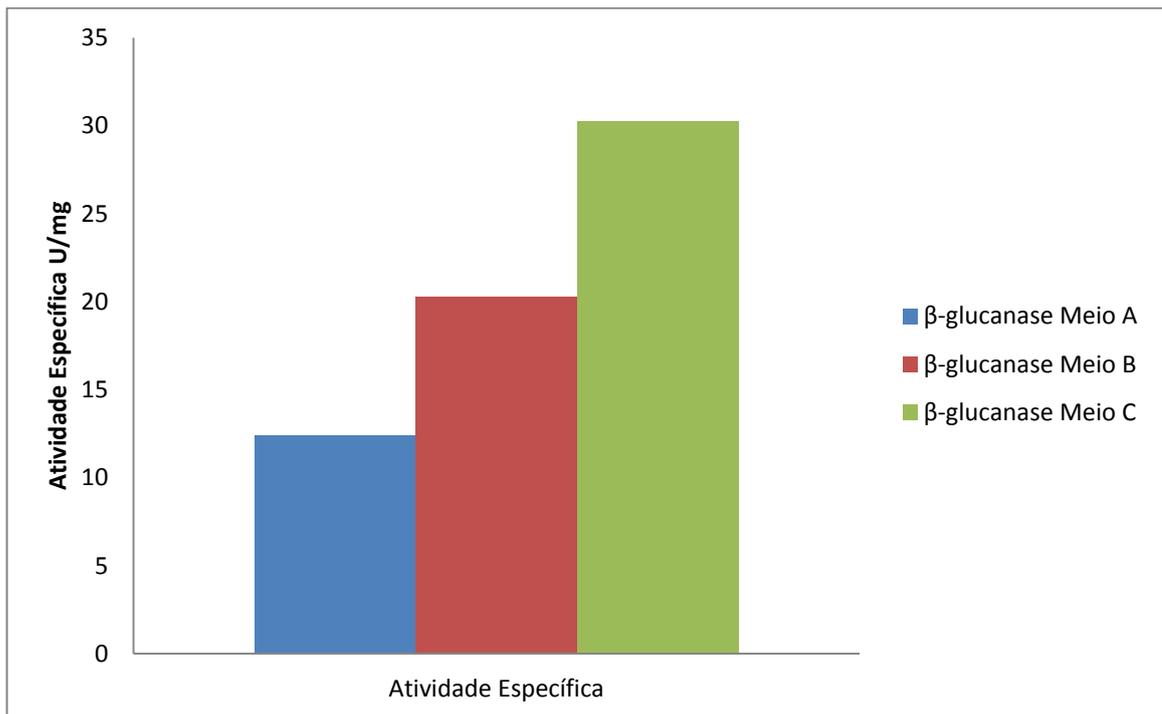


Figura 7. Atividades específicas de β -glucanase obtidas nos meios A, B e C.

4.2. Produção de β -glucanase em biorreator

Com o meio que resultou em maior produção em agitador orbital da enzima β -glucanase produziu-se a enzima em biorreator, e os resultados obtidos estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Dosagem de proteínas totais, enzima, atividade enzimática, atividade específica de β -glucanase produzida em biorreator.

Meio	Abs (595 nm)	Proteínas Totais (mg/mL)	Abs (540 nm)	Atividade Enzimática (U/min/mL)	Atividade Específica (U/mg)
Meio C	0,023	0,025	0,021	8,56	336,83

4.3. Determinação de proteínas totais nas amostras liofilizadas

Todas as amostras do meio contendo lipase foram liofilizadas e ressuspensas, lipase em tampão fosfato pH 6,5, 50 mM e as amostras contendo β -glucanase foram ressuspensas em tampão acetato pH 5,0, 50 mM. A dosagem de proteínas totais foi utilizada para calcular a atividade específica em todos os testes de estabilidade avaliados nos parâmetros cinéticos. Os valores obtidos para as amostras constam na tabela 9. O fungo crescido no meio A manteve a maior concentração de proteínas totais, seguido dos crescimentos nos meios C e B. Para as amostras de β -glucanase, o fungo *T. reesei* maior produtor de proteínas totais foi o crescido no meio A, seguido dos crescidos nos meios B e C.

Tabela 9. Proteínas totais das enzimas liofilizadas.

Amostras	Abs (595 nm)	Proteínas Totais (mg/mL)
Lipase Meio A	0,649	1,076
Lipase Meio B	0,142	0,231
Lipase Meio C	0,145	0,236
β-glucanase Meio A	0,671	1,113
β-glucanase Meio B	0,642	1,065
β-glucanase Meio C	0,269	0,443
β-glucanase Biorreator Meio C	0,209	0,343

4.4. Parâmetros Cinéticos

4.4.1. Lipase

4.4.1.1. pH

As dosagens obtidas com os testes de pH e as atividades de cada enzima estão descritas na tabela 10. As atividades específicas da lipase são mostradas na tabela 11. Pode-se observar que as três amostras de lipase tiveram resultados semelhantes, aumento da atividade com elevação do pH apresentando um pico em pH 6,0 e uma acentuada queda no pH 6,5, cerca de 56% em A, 85% em B e 76% em C, representada na figura 8.

Tabela 10. Atividade de lipase em diferentes pH nos diferentes meios de crescimento.

pH	Abs (410 nm)			Atividade Enzimática (U/min/mL)		
	Meio A	Meio B	Meio C	Meio A	Meio B	Meio C
4,0	0,313	0,289	0,323	1391,11	1284,44	1435,56
5,0	0,724	0,540	0,411	3217,78	2400,00	1826,67
6,0	0,851	0,687	0,700	3782,22	3053,33	3111,11
6,5	0,377	0,102	0,165	1675,56	453,33	733,33
7,0	0,188	0,089	0,106	835,56	395,56	471,11
8,0	0,032	0,028	0,055	142,22	124,44	244,44

Tabela 11. Atividade específica de lipase em diferentes pH nos diferentes meios de crescimento.

pH	Atividade Específica (U/mg) Lipase		
	Meio A	Meio B	Meio C
4,0	1292,85	5560,37	6082,86
5,0	2990,50	10389,61	7740,11
6,0	3515,08	13217,89	13182,67
6,5	1557,21	1962,48	3107,35
7,0	776,54	1712,36	1996,23
8,0	132,18	538,72	1035,78

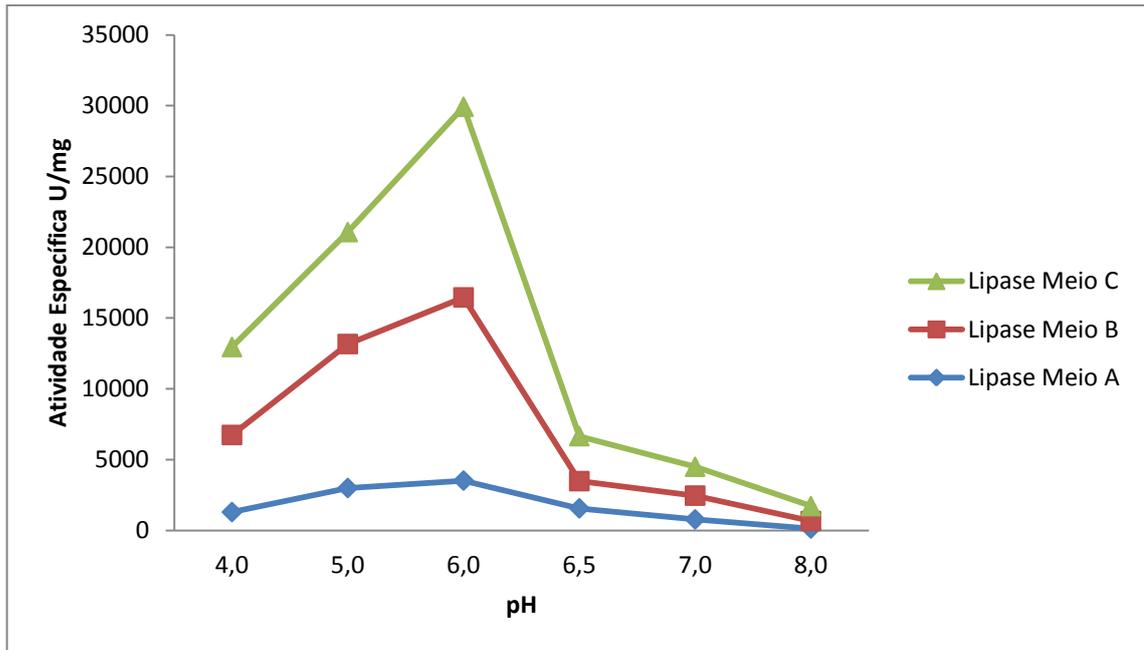


Figura 8. Avaliação do efeito de pH na atividade específica de lipase.

4.4.1.2. Temperatura

As dosagens obtidas com os testes de temperatura e as atividades das enzimas estão descritas na tabela 12 e as atividades específicas de cada amostra na tabela 13. Pode-se observar que as três amostras de lipase tiveram maior atividade a 30°C e um decréscimo na atividade com o aumento da temperatura, representada na figura 9.

Tabela 12. Atividade de lipase em diferentes temperaturas nos diferentes meios.

Temperatura °C	Abs (410 nm)			Atividade Enzimática (U/min/mL)		
	Meio A	Meio B	Meio C	Meio A	Meio B	Meio C
30	0,376	0,299	0,381	1671,11	1328,89	1693,33
40	0,349	0,143	0,369	1551,11	635,56	1640,00
50	0,119	0,060	0,109	491,53	266,67	484,44
60	0,003	0,019	0,035	12,39	84,44	155,56

Tabela 13. Atividade específica de lipase em diferentes temperaturas nos diferentes meios.

Temperatura °C	Atividade Específica (U/mg)		
	Lipase Meio A	Lipase Meio B	Lipase Meio C
30	1553,08	5752,77	7175,14
40	1441,55	2751,32	6949,15
50	491,53	1154,40	2052,73
60	12,39	365,56	659,13

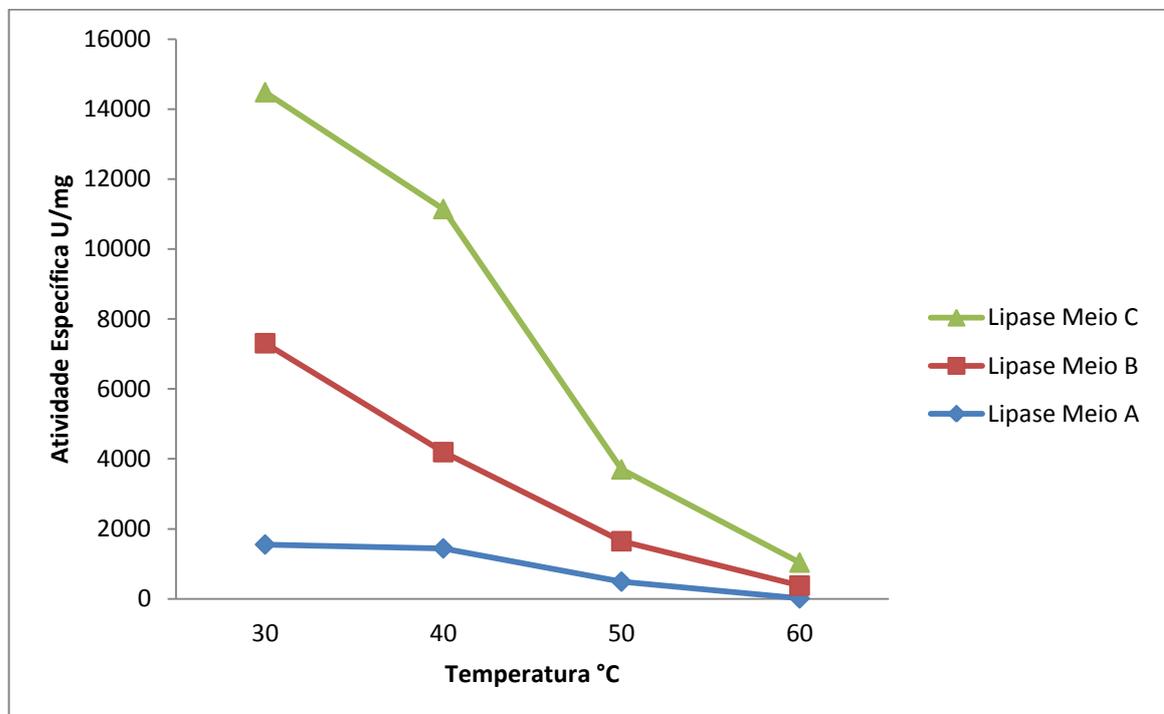


Figura 9. Avaliação do efeito de temperatura na atividade específica de lipase.

4.4.1.3. Íons

As dosagens obtidas com os testes do efeito de diferentes íons e as atividades das enzimas estão descritas na tabela 14 e as atividades específicas de cada amostra na tabela 15. A presença dos íons Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} inibiram a atividade da lipase produzida no meio A. Já para a lipase produzida no meio B

apenas os íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} influenciaram positivamente na atividade da enzima. A presença dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} aumentaram a atividade da lipase produzida no meio C, sendo inibida apenas pela presença de Cu^{2+} . A tabela 16 contém a porcentagem de inibição em cada uma das amostras com a presença dos íons e representados graficamente na figura 10.

Tabela 14. Atividade de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Íons	Abs (410 nm)			Atividade Enzimática (U/min/mL)		
	Meio A	Meio B	Meio C	Meio A	Meio B	Meio C
Controle	0,363	0,235	0,123	1613,33	546,67	1044,44
Mg²⁺	0,395	0,524	0,270	1755,56	1200,00	2328,89
Mn²⁺	0,125	0,406	0,123	555,56	546,67	1804,44
Ca²⁺	0,120	0,354	0,042	533,33	186,67	1573,33
Cu²⁺	0,089	0,167	0,044	395,56	195,56	742,22
Zn²⁺	0,432	0,534	0,243	1920,00	1080,00	2373,33
Fe³⁺	0,349	0,122	0,175	1551,11	777,78	542,22

Tabela 15. Atividade específica de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Íons	Atividade Específica (U/mg)		
	Meio A	Meio B	Meio C
Controle	1499,38	2316,38	4521,40
Mg²⁺	1631,56	5194,81	9868,17
Mn²⁺	516,32	2366,52	7645,95
Ca²⁺	495,66	808,08	6666,67
Cu²⁺	367,62	846,56	3145,01
Zn²⁺	1784,39	4675,33	10056,50
Fe³⁺	1441,55	3367,00	2297,55

Tabela 16. Porcentagem de inibição da atividade de lipase na presença de diferentes íons nos diferentes meios.

Íons	% de Atividade de Lipase		
	Meio A	Meio B	Meio C
Controle	100	100	100
Mg²⁺	109	224	218
Mn²⁺	34	102	169
Ca²⁺	33	35	147
Cu²⁺	25	37	70
Zn²⁺	119	202	222
Fe³⁺	96	145	51

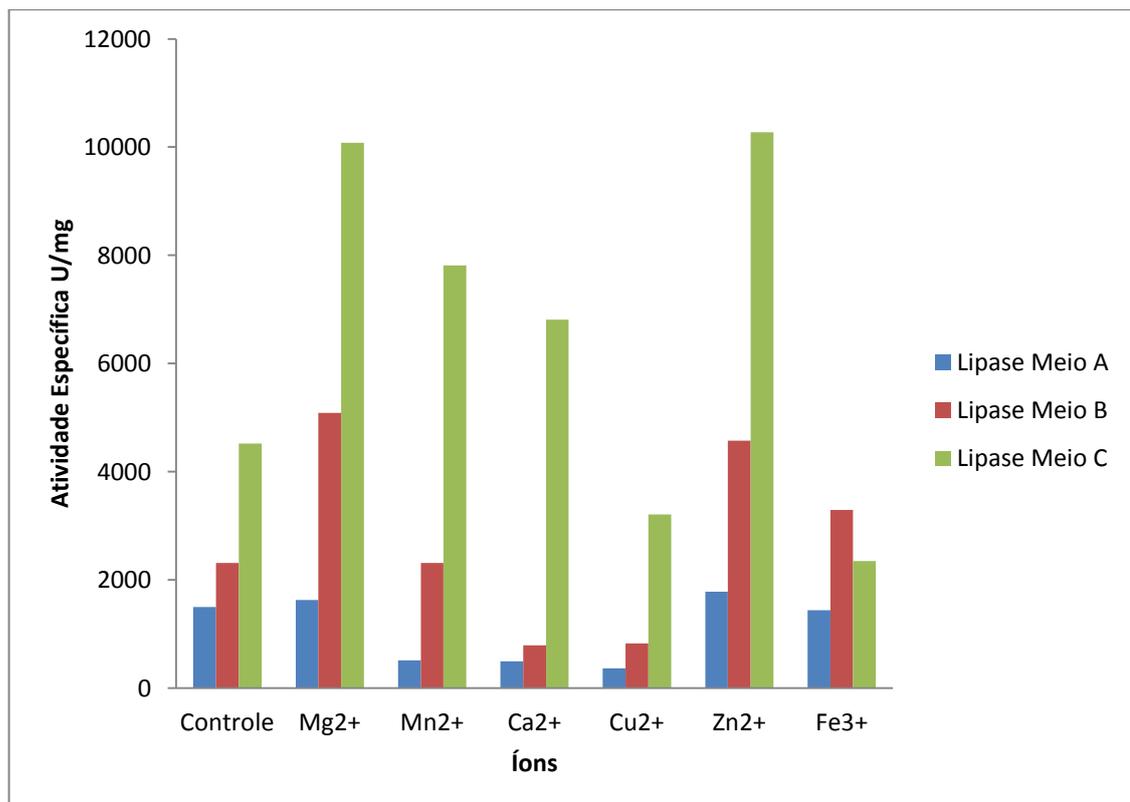


Figura 10. Avaliação do efeito da presença de íons na atividade específica de lipase.

4.4.2. β -glucanase

4.4.2.1. pH

As dosagens obtidas com os testes de pH nas amostras de β -glucanase estão descritas nas tabelas 17, 18 e 19. Pode-se observar que as quatro amostras tiveram um comportamento semelhante com uma crescente da atividade com o aumento do pH com pico em pH 5,0 e uma acentuada queda no pH 7,0 (figura 11).

Tabela 17. Atividade de β -glucanase em diferentes pH (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

pH	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
4,0	0,100	0,137	7,21	5,26
5,0	0,206	0,207	10,89	10,84
6,0	0,084	0,050	2,63	4,42
7,0	0,042	0,036	1,89	2,21
8,0	0,033	0,024	1,26	1,74

Tabela 18. Atividade de β -glucanase em diferentes pH (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

pH	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio C	Biorreator Meio C	Meio C	Biorreator Meio C
4,0	0,557	0,580	29,32	305,26
5,0	0,720	0,736	37,90	387,37
6,0	0,481	0,534	25,32	281,05
7,0	0,134	0,439	7,03	231,05
8,0	0,127	0,284	6,68	149,47

Tabela 19. Atividade específica de β -glucanase em diferentes pH em diferentes meios.

pH	Atividade Específica (U/mg) β -glucanase			
	Meio A	Meio B	Meio C	Biorreator Meio C
4,0	6,48	4,94	66,18	889,98
5,0	9,79	10,18	85,54	1129,35
6,0	2,36	4,15	57,15	819,40
7,0	1,70	2,08	15,92	673,62
8,0	1,13	1,63	15,09	435,78

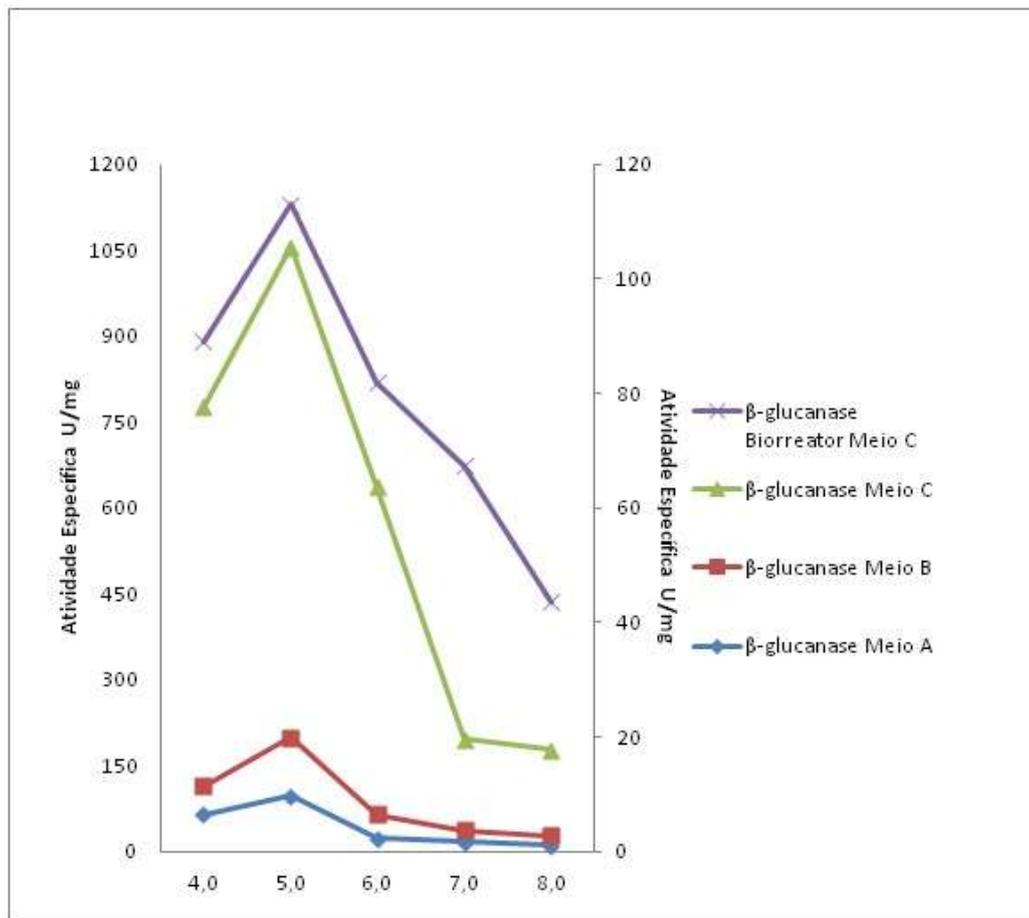


Figura 11. Avaliação do efeito de pH na atividade específica de β -glucanase.

4.4.2.2. Temperatura

As dosagens obtidas com os testes de temperatura nas amostras de β -glucanase estão descritas nas tabelas 20, 21 e 22. Pode-se observar que todas as amostras tiveram um comportamento semelhante com maior atividade a 37°C e com um decréscimo na atividade com o aumento da temperatura, representada na figura 12.

Tabela 20. Atividade de β -glucanase em diferentes temperaturas. (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

Temperatura °C	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
30	0,031	0,087	4,58	1,63
37	0,269	0,335	17,63	14,16
40	0,220	0,049	2,58	11,58
50	0,015	0,031	1,63	0,79
60	0,008	0,013	0,68	0,42

Tabela 21. Atividade de β -glucanase em diferentes temperaturas (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

Temperatura °C	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio C	Biorreator Meio C	Meio C	Biorreator Meio C
30	0,544	0,203	28,63	106,84
37	0,749	0,578	39,42	304,21
40	0,552	0,480	29,05	252,63
50	0,367	0,197	19,32	103,68
60	0,106	0,165	5,58	86,84

Tabela 22. Atividade específica de β -glucanase em diferentes temperaturas em diferentes meios.

Temperatura °C	Atividade Específica (U/mg) β -glucanase			
	Meio A	Meio B	Meio C	Biorreator Meio C
30	4,11	1,53	64,63	311,49
37	15,84	13,29	88,99	886,91
40	2,32	10,87	65,58	736,54
50	1,47	0,74	43,60	302,29
60	0,62	0,40	12,59	253,18

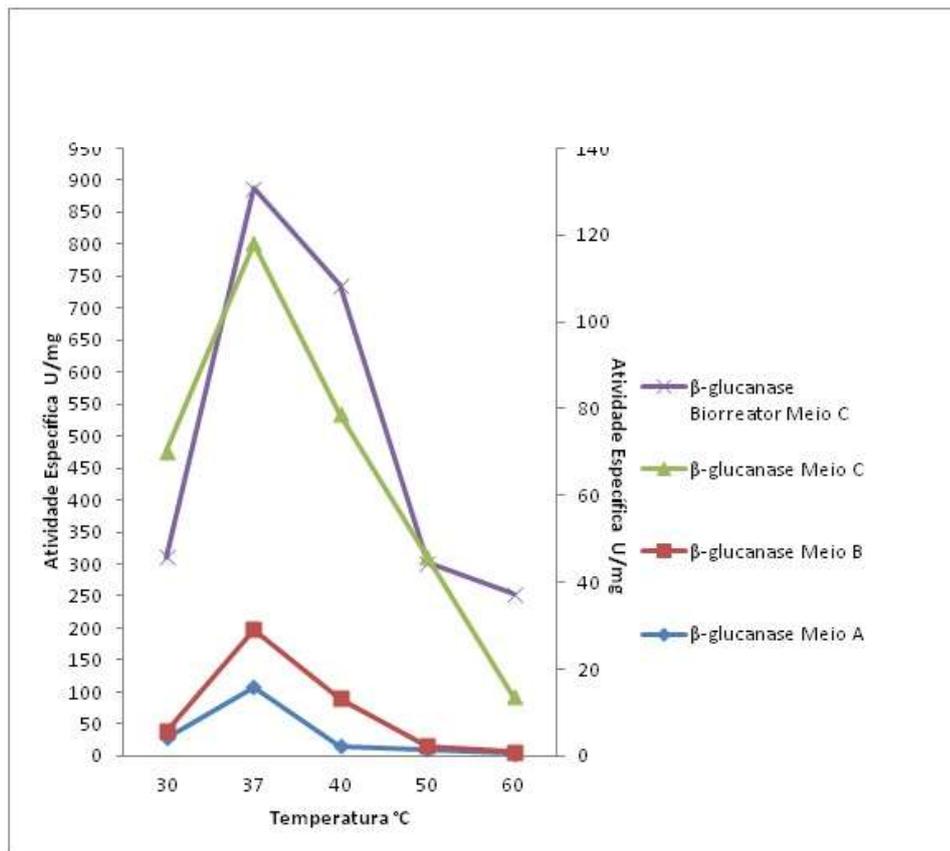


Figura 12. Avaliação do efeito de temperatura na atividade específica de β -glucanase.

4.4.2.3. Íons

As dosagens obtidas com os testes do efeito de diferentes íons e as atividades das enzimas estão descritas na tabela 23 e 24 e as atividades específicas de cada amostra na tabela 25. A presença dos íons Ca^{2+} , e Fe^{3+} aumentaram a atividade da β -glucanase produzida no meio A, sendo que a presença de Cu^{2+} não influenciou significadamente em sua atividade. Já para a β -glucanase produzida no meio B apenas os íons Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} influenciaram positivamente na atividade da enzima. A presença dos íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} aumentaram a atividade da β -glucanase produzida no meio C tanto no agitador orbital como no biorreator, assim como ambos foram inibidos pela presença de Cu^{2+} e Fe^{3+} . A tabela 26 contém a porcentagem de inibição em cada uma das amostras com a presença dos íons e representados graficamente na figura 13.

Tabela 23. Atividade de β -glucanase na presença de diferentes íons (β -glucanase Meio A e β -glucanase Meio B).

Íons	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio A	Meio B	Meio A	Meio B
Controle	0,026	0,056	1,37	2,77
Mg²⁺	0,015	0,058	0,79	3,05
Mn²⁺	0,011	0,083	0,58	4,37
Ca²⁺	0,029	0,069	1,53	3,63
Cu²⁺	0,027	0,065	1,42	3,42
Zn²⁺	0,014	0,028	0,74	1,47
Fe³⁺	0,049	0,052	2,58	2,74

Tabela 24. Atividade de β -glucanase na presença de diferentes íons (β -glucanase Meio C e β -glucanase Biorreator Meio C).

Íons	Abs (540 nm)		Atividade Enzimática (U/min/mL)	
	Meio C	Meio Biorreator C	Meio C	Biorreator Meio C
Controle	0,154	0,399	21,00	81,05
Mg²⁺	0,196	0,490	25,79	103,16
Mn²⁺	0,140	0,363	19,11	78,42
Ca²⁺	0,188	0,424	22,32	98,95
Cu²⁺	0,149	0,412	21,68	73,68
Zn²⁺	0,175	0,428	22,68	92,11
Fe³⁺	0,098	0,333	17,53	51,58

Tabela 25. Atividade específica de β -glucanase presença de diferentes íons em diferentes meios.

Íons	Atividade Específica (U/mg) β -glucanase			
	Meio A	Meio B	Meio C	Biorreator Meio C
Controle	1,23	2,77	47,40	236,30
Mg²⁺	0,71	2,87	58,22	300,75
Mn²⁺	0,52	4,10	43,13	214,82
Ca²⁺	1,37	3,41	50,37	288,48
Cu²⁺	1,28	3,21	48,95	228,63
Zn²⁺	0,66	1,38	50,85	268,53
Fe³⁺	2,32	2,57	39,56	150,38

Tabela 26. Porcentagem de inibição da atividade de β -glucanase presença de diferentes íons em diferentes meios.

Íons	% de Atividade da β -glucanase			
	Meio A	Meio B	Meio C	Biorreator Meio C
Controle	100	100	100	100
Mg ²⁺	58	103	123	127
Mn ²⁺	42	148	91	91
Ca ²⁺	111	123	106	122
Cu ²⁺	104	116	103	97
Zn ²⁺	54	50	107	114
Fe ³⁺	188	93	83	64

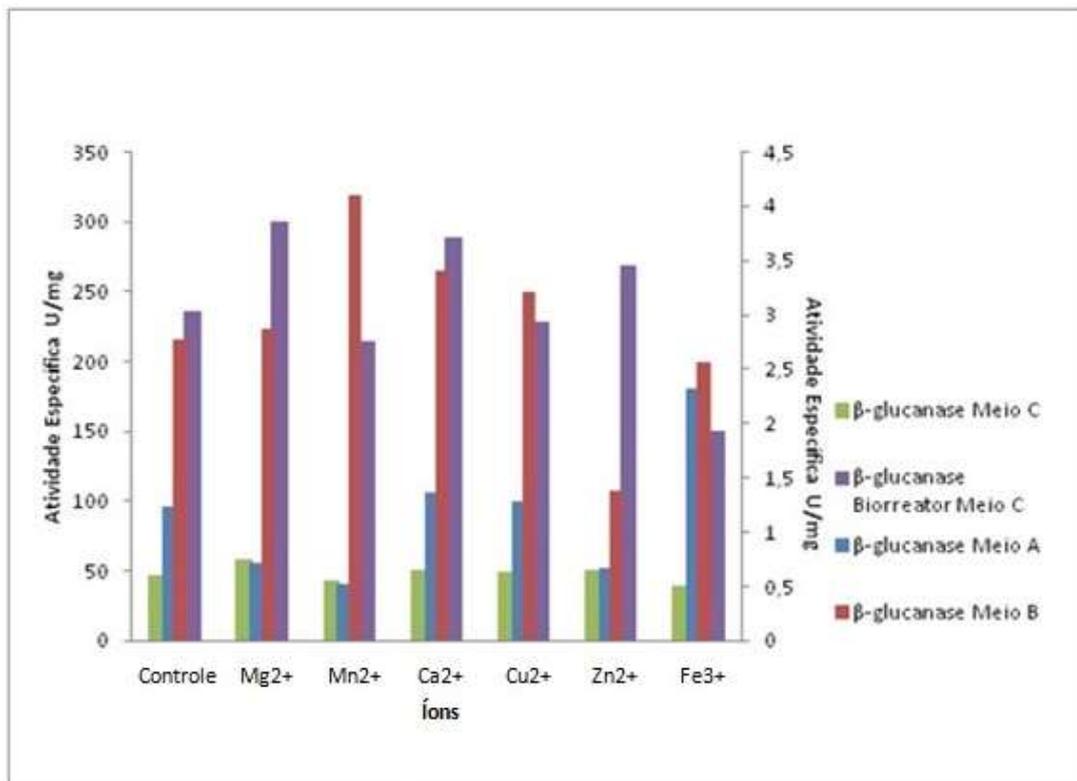


Figura 13. Avaliação do efeito da presença de íons na atividade específica de β -glucanase.

5. DISCUSSÃO

A importância das enzimas em diferentes processos e aplicações, como na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, cosmética, química entre outras é potencial argumento para a realização de estudos como esse, que avaliou o efeito dos componentes do meio na indução da produção pelos fungos e a partir disso. Com as enzimas produzidas realizou-se a avaliação do efeito de parâmetros cinéticos importantes na ação enzimática, o pH, a temperatura e a presença de íons. Com os resultados obtidos pode-se adequar processos com o intuito de otimizar o uso de enzimas, obtendo melhores resultados. No caso, as enzimas a serem produzidas têm foco de aplicação na produção de detergentes e limpantes enxaguatórios, visto que aspectos econômicos e técnicos levaram a substituição dos sabões por produtos sintéticos. Um dos aspectos envolveu a escassez das gorduras que passaram a ser destinadas a consumo humano e animal e o outro se deve à formação de sais insolúveis com agentes de dureza da água, tais como cálcio e magnésio, que levam à sua insolubilização em meio neutro e ácido. O resultado da aplicação enzimática nestes produtos inclui o aumento da adsorção e, conseqüentemente, o aumento da remoção de gorduras, acrescentando uma maior eficiência ao detergente. Estes aspectos levam à diminuição dos danos ao ambiente e à saúde humana (LIMA et al; 2002).

Além disso, a produção de enzimas como as β -glucanases, em maior escala ainda tem custo elevado devido ao substrato utilizado como indutor da enzima. Novas pesquisas sobre a regulação da síntese destas hidrolases por via fermentativa, purificação e mecanismo de ação ainda são necessárias para ampliar a compreensão e exploração delas no desenvolvimento de novas tecnologias (BON et al; 2008).

As lipases tem seu papel bem conhecido, tanto como fator de virulência em infecções de origem microbiana, bem como em aplicações em processos biotecnológicos, sendo que este último tem aumentado a cada dia devido à sua capacidade para realizar síntese de ésteres ou hidrólise, dependendo das condições da reação que catalisa (JAEGER et al; 1994).

A biomassa obtida na fermentação não necessariamente reflete na quantia da produção enzimática pelo micro-organismo, desta forma é possível a obtenção de maior biomassa e menor produção de enzimas (GIESE et al; 2003) ou o inverso, assim como a proporcionalidade também pode acontecer, como nesse estudo, que a β -glucanase obtida do meio B registrou maior biomassa em relação a produzida no meio A, assim como a sua atividade enzimática.

O peso úmido obtido com a lipase produzida com o meio A é cerca de 16 vezes maior que as obtidas com o meio em B e 21 vezes maior que o C, porém a porcentagem de perda maior foi registrada para as biomassas dos meios B e C, com cerca de 81% de perda.

Para a β -glucanase produzida com o meio B o peso úmido obtido é cerca de 8 vezes maior que as obtidas com os meios A e C, porém a porcentagem de perda maior foi registrada para as biomassas dos meios A, com 63%, e C, com cerca de 58% de perda.

Em relação a produção de proteínas, a lipase obtida do meio A apresentou maior produção de proteínas totais, 0,488 mg/mL, seguido do meio C, 0,091 mg/mL, e B, 0,086 mg/mL, assim como a atividade de lipase 170,31, 67,08 e 55,08 U/min/mL, respectivamente. Entretanto, ao relacionar ambos resultados para a obtenção da atividade específica de cada meio verificou-se que o meio C induz a

produção por parte de *A. niger* maior de lipase mais ativa, 737,93 U/mg, seguido do meio B, 635,99 U/mg, e A, 348,99 U/mg.

A β -glucanase produzida com o meio A apresentou maior produção de proteínas totais, 0,69 mg/mL, seguido dos meios B, 0,68 mg/mL, e C, 0,16 mg/mL, porém, para a produção de β -glucanase, o meio B induziu a maior produção, 13,75 U/min/mL, que A e C, 8,57 e 8,22 U/min/mL, respectivamente. Entretanto, ao relacionar ambos resultados para a obtenção da atividade específica de cada meio verificou-se que o meio C produz relativamente mais β -glucanase, 30,21 U/mg, em meio a produção total de proteínas, seguido dos meios B, 20,26 U/mg, e A, e 12,38 U/mg. Tal resultado pode ser explicado, pois os componentes do meio de cultivo podem influenciar diretamente a produção das β -glucanases, especialmente a natureza química e concentração de fontes de carbono dos meios, que são: glicose, xilose e lactose para o meio A, farelo de trigo para o meio B, sacarose para o meio C e a fontes de nitrogênio, que são: NH_4NO_3 para o meio A, NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para o meio B e NaNO_3 para o meio C. De acordo com Bielecki e Galas (1991) e Giese et al. (2003), pode haver repressão da produção da enzima por alguns micro-organismos por excesso de glicose ou outra fonte facilmente acessível.

O produto obtido da fermentação realizada no agitador orbital possui diferenças quando comparado ao produto obtido no biorreator. Isso porque as condições do crescimento do micro-organismo são diferentemente controladas nos dois processos, no agitador orbital não há controle de pH assim como acontece no biorreator, que possui entradas para injeção de ácido e base que ocorre automaticamente através de um motor que injeta volumes sempre que necessários de soluções, previamente preparadas e esterilizadas, mantendo o pH no valor que o biorreator foi calibrado. Além disso, a aeração no biorreator é mais precisa, visto que

também possui uma haste que injeta o ar de acordo com a regulação da bomba ligada a ele, possibilitando a determinação do volume de ar por minuto injetado, o que não acontece no agitador orbital. O aumento da concentração de oxigênio no meio de cultivo pode levar a um aumento da produção de β -glucanase, como relataram Jayus et al. (2005). Tais fatores são de extrema importância e a maior atividade obtida na produção da enzima β -glucanase Biorreator Meio C, cerca de 11 vezes maior, quando comparada com a β -glucanase Meio C (agitador orbital) pode ser explicada pelo controle eficiente de tais parâmetros, mantendo as condições ótimas de indução necessárias para o micro-organismo produzir a enzima desejada.

O processo de precipitação por fracionamento com sulfato de amônio é realizado com o intuito de concentrar a enzima. Sendo assim, quando se compara o extrato bruto obtido da fermentação com as amostras precipitadas, constata-se que dentre as amostras de lipase, a resultante do meio A manteve a maior concentração de proteínas totais, seguido de das resultantes dos meios C e B após o processo de liofilização, todos com maior atividade específica do que a encontrada no extrato bruto. Para as amostras de β -glucanase, a maior produção de proteínas totais foi a resultante do meio A, seguido dos meios B e C, mantendo as características do produto da fermentação antes da precipitação e liofilização.

Os testes variando os parâmetros que influenciam na cinética de atividade enzimática podem ser relacionados de diversas formas obtendo diferentes resultados. Ao analisar separadamente como três parâmetros específicos que atuam na atividade das enzimas foi possível obter o melhor pH, temperatura e a influência da presença de íons para atividade das enzimas estudadas. Observou-se que a lipase apresentou um aumento da atividade com a elevação do pH com pico em pH 6,0 e uma acentuada queda de atividade no pH 6,5, cerca de 56% em A, 85% em B

e 76% em C, que continuou com o aumento do pH, estes resultados foram semelhantes aos observados por Silva et al. (2008) que registrou maior atividade hidrolítica entre os pHs 6,0 e 6,5 com *A. niger*.

Enquanto para as β -glucanases ocorreu um aumento da atividade com a elevação do pH com maior atividade em pH 5,0 e uma acentuada queda de atividade a partir do pH 7,0, assim como descrito por Marco e Felix (2007) e El-Katatny et al. (2000) que utilizaram o *T. harzarium* e por Budiarti et al. (2009) com *T. reesei*. Provavelmente os valores obtidos são resultantes do melhor rearranjo do sítio catalítico da enzima nos tampões nos quais a atividade enzimática foi maior.

Quanto à variação da temperatura observou-se lipase com maior atividade a 30°C e com um decréscimo na atividade com o aumento da temperatura, assim como Pera et al. (2006). Silva et al. (2008) obtiveram maior atividade entre 30 e 35°C e Carvalho et al. (2005) de 35 a 45°C com *A. niger*.

A β -glucanase, porém registrou maior atividade a 37°C, assim como Katatny et al. (2000), que verificou uma maior atividade em torno de 30°C com *T. harzarium*, porém Kulminskaya (2001) observou temperatura ótima a 55°C com *T. viride*, Marco e Felix (2007) a 50°C com *T. harzarium* assim como Budiarti et al. (2009) com *T. reesei*.

As dosagens obtidas com os testes do efeito de diferentes íons e as atividades das enzimas mostraram que a presença dos íons Mn^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+} inibiram a atividade da lipase produzida no meio A em 34%, 33% e 25%, respectivamente. Para a lipase produzida no meio B e C apenas os íons Mg^{2+} (224 e 218%), Mn^{2+} , (102 e 169%), Zn^{2+} (202 e 222%), respectivamente, influenciaram positivamente na atividade da.. De acordo com Chartrain et al. (1993), a presença de Zn^{2+} levou a inibição da atividade de lipase produzida por *P. aeruginosa* e a presença de Ca^{2+}

aumentou a atividade. Lin et al. (1996) destacou que lipases de *P. pseudoalcaligenes* são inibidas na presença de Fe^{3+} , assim como Sharon et al. (1998), que também destacou aumento da atividade da enzima na presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Hiol et al. (2000) verificou a inibição na presença de Fe^{3+} e Cu^{2+} .

A presença dos íons Ca^{2+} e Fe^{3+} aumentaram a atividade da β -glucanase produzida no meio A em cerca de 111 e 188%, respectivamente. Já para a β -glucanase produzida no meio B os íons Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} influenciaram positivamente na atividade da enzima com 148, 123, 116%, respectivamente. A presença dos íons Mg^{2+} (123 e 127%), Ca^{2+} (106 e 122%) e Zn^{2+} (107 e 114%) aumentaram a atividade da β -glucanase produzida no meio C tanto no agitador orbital como no biorreator, assim como ambos foram inibidos pela presença de Fe^{3+} (83 e 64%).

Dubordieu et al. (1985) registrou que houve inibição da atividade β -glucanase na presença de íon Cu^{2+} e Mn^{2+} de *T. harzarium* e houve aumento a atividade na presença Ca^{2+} e Zn^{2+} . Assim como Noronha e Ulhoa (2000) com o mesmo micro-organismo registrou as mesmas características exceto pela inibição por Mn^{2+} . Felix e Marco (2007) registraram extrema inibição na presença de Fe^{3+} porém nenhuma influencia significativa na presença de Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} . Kulminskaya et al. (2001) verificou inibição por parte Zn^{2+} e Mg^{2+} , indução por parte de Mn^{2+} e praticamente nenhuma alteração na atividade a presença de íons Ca^{2+} para a enzima produzida por *T. viride* e Yi et al. (2008) registraram inibição com a presença dos íons Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} , enquanto que na presença de Zn^{2+} , Fe^{3+} e Ca^{2+} houve aumento na atividade da enzima.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que diferenças na composição dos meios de cultura aos quais os fungos são submetidos no processo de fermentação interferem diretamente na atividade que a enzima produzida apresentará, explicado pelas diferentes fontes de carbono e nitrogênio neles presentes. As maiores atividades específicas obtidas foram de 737,93 U/mg para a lipase e 30,21 U/mg para a β -glucanase.

Estudos envolvendo a estabilidade de enzimas frente aos diferentes parâmetros cinéticos de atividade são importantes para a indústria biotecnológica e todas suas aplicações. Com o estudo verificou-se que a lipase apresentou melhor atividade a 30°C, em pH 6,0 e na presença dos íons Mg^{2+} e Zn^{2+} . A β -glucanase apresentou maior atividade quando submetida a 37°C e pH 5,0 e na presença dos íons Mg^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} .

Sendo assim, o trabalho realizado é uma ferramenta de amplo uso para aplicações industriais de enzimas, visto que traz resultados que podem levar a escolha de melhores condições de produção ou aplicação de enzimas em produtos ou processos, levando a otimização e melhores resultados com menores custos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, M; BRAGULAT, M; CASTELLÁ, G; CABAÑES, F. "Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger*. Applied and Environmental Microbiology, v. 60, n. 7, p. 2650-2655, 1994.

BAUERMEISTER, A; REZENDE, M; GIESE, E; DEKKER, R; BARBOSA, A. β -1,3-Glucanases: production and biotechnological applications. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 31, n. 2, p. 75-86, jul./dez. 2010.

BRADFORD, 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 (1-2), p. 248-254, 1976.

BIELECKI, S; GALAS, E. Microbial β -glucanases different from cellulases. Biotechnology, Frankfurt, v. 10, p. 275-304, 1991.

BON, E; FERRARA, M; CORVO, M. Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado. Editora: Interciência. 1ª Ed, 2008.

BUDIARTI, S; WIDYASTUTI, S; MARGINO. Purification and Characterization of β -1,3-Glucanase from Antagonistic Fungus *Trichoderma reesei*. Journal of Biosciences. September 2009, p 115-119.

CARVALHO, P; CALAFATTI, S; MARASSI, M; SILVA, D; CONTESINI, F; BIZACO, R. Potencial de Biocatálise Enantiosseletiva de Lipases microbianas. Quim. Nova, Vol. 28, nº 4, 614-621, 2005.

CHARTRAIN, M; KATZ, L; MARCIN, C; THIEN, M; SMITH, S; FISHER, E, et al. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. Enzyme Microb Technol, 15: 575-80, 1993.

CIHANGIR, N; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 20, 193-197. 2004

DAWSON, R.M.C.; ELLIOT, D.C.; ELLIOT, W.H.; JONES, K.M. Biochemical Research, New York: Oxford University Press, 2 ed, 1969, 654 p.

DUBOURDIEU, D; DESPLANQUES, C; VILLETZAZ, J; RIBEREAU-GAYON, P. Investigations of an industrial β -D-glucanase from *Trichoderma harzianum*. Carbohydrate Research, v.144, p. 277-287, 1985.

EL-KATANY, M; SOMITSCH, W; ROBRA, K.-H; KATANY, M; GÜBITZ, G. Production of Chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for Control of Phytopathogenic Fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technol. Biotechnol. 38 (3) 173-180 (2000).

GAMS, W, BISSET, J. Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium* (CHRISTIAN, P; KUBICEK, S; GARY, E; eds), PP. 3-34, 1998.

GANDHI, N. Applications of Lipase. *JAOCS*, Vol. 74, nº 6, Canada, 1997.

GIESE, E; BARBOSA, A; SILVA, M. Glucanases Fúngicas. Produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases. *Revista Biotecnológica Ciência e Desenvolvimento*. Edição nº 30, 2003.

HASAN, F; SHAH, A; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 235-251.

HIOL, A; RUGANI, N; DRUET, D; SARDA, L; CORNEAU, LC. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme Microb Technol*, 26:421-30, 2000.

JAEGER, K; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotchnology* 2002, 13: 390-397.

JAEGER, K; RANSAC, S; DIJKSTRA, B; COLSON, C; HEUVEL, M; MISSET, O. Bacterial lipases. *FEMS Microbial. Rev.*, v.15, p. 29-63, 1994.

JAYUS; McDOUGALL, B; SEVIOUR, R. The effect of dissolved oxygen concentrations on β -1,3-glucanases and β -1,6-glucanases production by *Acremonium* sp. IMI 383068 in batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 36, p. 176-181, 2005.

KUHAD, R; GUPTA, R; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. Volume 2011, Article ID 280696, 10 pages.

KULMINSKAYA, A; THOMSEN, K; SHABALIN, K, SIDORENKO, I; ENEYSKAYA, E; SAVEL'EV, A; NEUTROEV, K. Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3- β -glucanase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 286, 6123-6131 (2001).

LIMA, L. Elementos de microbiologia. In: LIMA, U. A., AQUARONEM, BORZANI, W, coord. *Tecnologia das fermentações*, v. 1, Edgar Blücher, São Paulo, 1975, p. 1-18.

LIMA, U; AQUARONE, E; BORZANI, W; SHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial V.3 Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Editora: Edgard Blücher Ltda. 1ª Ed, 2002.

LIN, S; CHIOU, C; YEH, C; TSAI, Y. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl Environ Microbiol.* 62:1093-5, 1996.

MAHADIK, N; BASTAWDE, K; PUNTAMBEKAR, U; KHIRE, J; GOKHALE, D. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. *Process Biochemistry* 39 (2004) 2031–2034.

MARCO, J; FELIX, C. Purification and Characterization of a β -Glucanase Produced by *Trichoderma harzarium* Showing Bioncontrol Potential. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Vol. 50, n. 1: pp. 21-29, January 2007.

MAYORDOMO, I; RANDEZ-GIL, F; PIETRO, J. Isolation, Purification, and Characterization of a Cold-Active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 105-109.

MHETRAS, N; PATIL, S; GOKHALE. Lipase of *Aspergillus niger* NCIM 1207: A Potencial Biocatalyst for Synthesis of Isoamyl Acetate. *INDIAN J Microbiol (Ocy-Dec 2010)* 50(4):432-437.

NELSON, D; COX, M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Editora: Omega. 5ª Ed. 2011.

NORONHA, E; KIPINIS, A; JUNQUEIRA-KIPINIS, A; ULHOA, C. Regulation of 36-kDa β -1,3-glucanase synthesis in *Trichoderma harzarium*. *FEMS Microbiology Letters*, v.188, p.19-22, 2000.

NORONHA, E; ULHOA, C. Regulation of 29-kDa β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*, v.183, p. 119-123, 2000.

PERA, L; ROMERO, C; BAIGORI, M; CASTRO, G. Catalytic Properties of Lipase Extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (2) 247-252, 2006.

RONALD M ATLAS. *Handbook of Microbiological media*. Fourth edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 2010, pp. 2036.

SAISUBRAMANIAN, N; EDWINOLIVER, N; NANDAKUMAR, N; KAMINI, N; PUVANAKRISHNAN, R. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2006) 33: 669-676.

SAMUELS, G. *Trichoderma: a review of biology and systematic of the genus*. *Mycology Research*, v. 100, p. 923-935, 1996.

SANTOS, E. *Produção e avaliação das aplicações de enzimas quitinolíticas e queratolíticas*. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Araraquara, São Paulo, 2011.

SHARMA, R; CHISTI, Y; BANERJEE, U. *Biotechnology Advances* 19 (2001) 627-662.

SHARON, C; FURUGOH, S; YAMAKIDO, T; OGAWA, H; KATO, Y. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 20:304-7, 1998.

SILVA, V; CONSTESINI, F; CARVALHO, P. Characterization and Catalytic Activity of Free and Immobilized Lipase from *Aspergillus niger*: a Comparative Study. *Sociedade Brasileira de Química*, v. 19, nº 8, 1468-1474, 2008.

SUZUKI, K; YABE, T; MARUYAMA, Y; ABE, K; NAKAJIMA, T. Characterization of recombinant yeast $\text{exo-}\beta\text{-1,3}$ -glucanase (Exg 1p) expressed in *Escherichia coli* cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Tokyo, v. 65, p. 1310-1314, 2001.

TREICHEL, H; OLIVEIRA, D; MAZUTTI, M; LUCCIO, M; OLIVEIRA, J. A Review on Microbial Lipases Production. *Food Bioprocess Technol*, 2010 3: 182-196.

YI, H; XIONG, S; DU, M; ZHANG, L. Purification and partial characterization of β -glucanase produced by *Trichoderma viride* TP09 isolated from sewage of beer-making. *European Food Research and Technology*, Berlin, v. 277, p. 821-826, 2008.

ZHU, D; WU, Q; WANG, N. *Comprehensive Biotechnology. Industrial Enzymes*. 2 ed. Canada: Elsevier. Cap. 3 (2), p. 3-13, 2011.

De acordo,

Orientadora: Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Assinatura

Araraquara, ____ de _____ de 2013

Aluna: Juliane Vicentino Ferreira da Silva

Assinatura

Araraquara, ____ de _____ de 2013