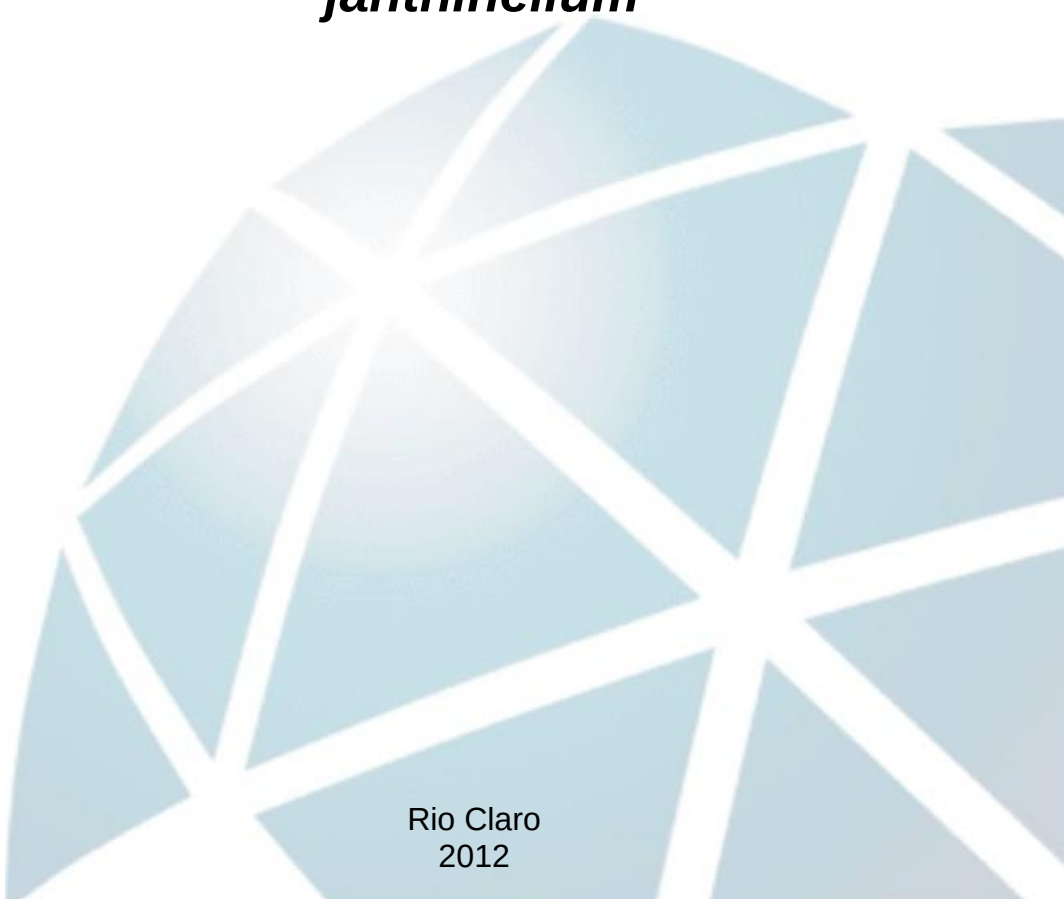

Ciências Biológicas

DANIELA FLAVIA MACHADO TURATI

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS
NUTRICIONAIS E FÍSICOS SOBRE A
PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Penicillium
janthinellum***



Rio Claro
2012

DANIELA FLAVIA MACHADO TURATI

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS NUTRICIONAIS E FÍSICOS SOBRE A
PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Penicillium janthinellum***

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

Co-orientador: Dr. Alex Fernando de Almeida

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro-SP

2012

547.758 Turati, Daniela Flavia Machado
T929i Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de
lipase por *Penicillium janthinellum* / Daniela Flavia Machado Turati. - Rio
Claro : [s.n.], 2012
43 f. : il., figs., gráfs., tabs. + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Eleonora Cano Carmona
Co-Orientador: Alex Fernando de Almeida

1.Enzimas. 2. Produção de lipase. 3. *Penicillium janthinellum*. 4.
Lipase. 5. Regulação. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Dra. Eleonora C. Carmona, pela oportunidade da realização deste trabalho, por toda atenção e dedicação, sempre disponibilizando seu tempo, e por compartilhar todo seu conhecimento.

Ao co-orientador Dr. Alex Fernando de Almeida, muito obrigada por toda a paciência, dedicação e atenção, por todos os ensinamentos e, principalmente, por ter despertado meu verdadeiro interesse pela área.

Aos companheiros de laboratório, Carmen, Cárol, Fabiana, César e Alexandre, por toda ajuda e pelos momentos juntos, fazendo com que o trabalho fosse mais prazeroso.

À minha família, em especial meus pais, Ulisses e Lola, meus irmãos, Luiz e Juliana, e minha avó, Flora, por toda a confiança depositada nessa minha louca jornada, me estendendo a mão sem julgamentos, sem restrições, sem empecilhos. O amor incondicional que nos une é o principal motivo do meu sucesso nesta etapa, o que me mantém caminhando apesar de toda a saudade. Muito obrigada por construírem meu futuro junto comigo, caminhando ao meu lado, eu amo muito vocês.

Ao meu namorado, Wendell Lima, por todo apoio, carinho, compreensão e parceria, mas principalmente, por toda paciência. Eu sei que não é fácil aguentar minhas lamentações, frustrações e mau-humor. Você foi essencial para que esse trabalho se concretizasse, muito obrigada por todas as horas me esperando no laboratório e por me ajudar a cuidar dos experimentos. Você é sensacional! Te amo.

A todo CBI 2009, minha família rioclarense, que fez eu me sentir em casa mesmo a 200 km de distância. Partilhar esses anos maravilhosos com vocês foi um privilégio, seja na euforia de uma balada, na simplicidade de uma conversa jogada fora, na cumplicidade dos momentos difíceis ou na parceria de toda essa caminhada. “EU AMO MUITO A GENTE!”. Gostaria de citar em especial Lídia Duarte, Larissa Braz, Paula Bertoli, Abigail Savietto, Jussara Chaves, Laryssa Teixeira, Letícia Souza, Maria Luisa Soares e Vanessa Wendt, muito obrigada por tudo meninas!

À família vôleibol, por permitir que a expressão do meu amor por esse esporte continuasse nessa fase da minha vida. As emoções vividas foram únicas, com certeza sendo decisivas na minha adoração pelo Interunesp! Sem vocês, seria apenas mais um conjunto de baladas universitárias.

RESUMO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações ésteres dos triacilgliceróis de cadeia longa, operando na interface óleo/água. Em meios orgânicos, dependendo da quantidade de água, essas enzimas podem catalisar reações de esterificação e transesterificação, atuando como biocatalisadores da síntese de óleos e gorduras. As lipases destacam-se em processos industriais, nos quais são utilizadas como aditivos na produção de detergentes, de papel e celulose, na indústria de laticínios, de cosméticos, entre outros. As lipases microbianas são de maior interesse para aplicação em biotecnologia e em química orgânica, sendo necessária a prospecção de novas fontes de lipases com propriedades distintas. O presente trabalho avaliou a influência de diferentes meios de cultura, do tempo de cultivo, de fontes de carbono e sua concentração, de fontes de nitrogênio, agitação, pH e temperatura sobre a produção de lipase extracelular pelo fungo filamentoso *Penicillium janthinellum*, isolado de solo de região de Mata Atlântica. A avaliação das melhores condições de cultivo foi realizada através da análise da atividade enzimática, acompanhada pela determinação do íon p-nitrofenol liberado na hidrólise do substrato sintético p-nitrofenil palmitato. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125mL contendo 25mL de meio de cultivo, inoculados com 1mL de suspensão contendo 10^7 conídios, e incubados a 28°C com agitação de 160 rpm e pH 5,5. Entre os quatro meios de cultura testados, o melhor resultado ($0,476 \pm 0,04$ U/mL), com 5 dias de cultivo, foi verificado com o meio 2 composto por (g/L): bacto-peptona 5,0, extrato de levedura 1,0, NaNO_3 0,5, KCl 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, KH_2PO_4 2,0 e azeite de oliva 10,0). A maior produção de lipase foi observada em 3 dias de cultivo ($0,849 \pm 0,15$ U/mL). Treze fontes de carbono puras, dentre elas triacilgliceróis, ácidos graxos, carboidratos simples, alcoóis e ácidos orgânicos, e onze fontes de carbono complexas, como óleos vegetais e gorduras animais, foram também analisadas. Destas, o azeite de oliva se apresentou como melhor indutor para a produção de lipase ($1,13 \pm 0,10$ U/mL), sendo essa fonte de carbono selecionada para prosseguir o estudo. A concentração de azeite de oliva que induziu a mais alta produção de lipase foi de 0,5% ($1,56 \pm 0,24$ U/mL) até 3% ($1,50 \pm 0,39$ U/mL). A temperatura de cultivo que apresentou maior produção de lipase foi de 28°C ($1,53 \pm 0,07$ U/mL). As concentrações das fontes de nitrogênio, o pH e a agitação foram avaliados através de um planejamento experimental fatorial fracionado (2^{5-1}), o qual indicou que estes parâmetros já se encontravam em níveis ótimos para o cultivo. O pH ótimo de atividade foi de 7,0 ($1,53 \pm 0,07$ U/mL) e a temperatura de 45°C mostrou-se ótima para a atividade desta lipase ($1,43 \pm 0,08$ U/mL). O estudo da produção de lipase por *P. janthinellum* é inédito e os resultados obtidos mostram-se promissores para posterior aplicação desta enzima, sendo também fundamentais para sua purificação e caracterização.

Palavras-chave: *Penicillium janthinellum*. Lipase. Produção. Regulação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 OBJETIVOS.....	13
<u>2.1 Objetivo geral</u>	13
<u>2.2 Objetivos específicos</u>	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
<u>3.1 Manutenção e cultivo da linhagem</u>	14
<u>3.2 Seleção do meio de cultura</u>	14
<u>3.3 Efeito de fatores físico-químicos sobre a produção de lipase por <i>P. janthinellum</i></u>	15
3.3.1 Influência do tempo de cultivo sobre o crescimento fúngico e produção de lipase.....	15
3.3.2 Influência das fontes de carbono.....	16
3.3.3 Influência da concentração da fonte de carbono.....	16
3.3.4 Influência da temperatura de cultivo.....	177
3.3.5 Influência das fontes de nitrogênio, pH e agitação do cultivo.....	17
<u>3.4 Caracterização bioquímica de lipase produzida por <i>P. janthinellum</i></u>	17
3.4.1 Determinação do pH ótimo de atividade.....	17
3.4.2 Determinação da temperatura ótima de atividade.....	17
3.5 <u>Métodos analíticos</u>	188
3.5.1 Avaliação do crescimento fúngico.....	18
3.5.2 Determinação da atividade lipase.....	18
3.5.3 Determinação de proteínas totais.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19

<u>4.1 Seleção do meio de cultura</u>	19
<u>4.2 Efeito de fatores físico-químicos sobre a produção de lipase por <i>P. janthinellum</i></u>	20
4.2.1 Influência do tempo de cultivo sobre o crescimento fúngico e produção de lipase.....	20
4.2.2 Influência das fontes de carbono.....	22
4.2.3. Influência da concentração da fonte de carbono.....	27
4.2.4. Influência da temperatura de cultivo.....	29
4.2.5. Influência das fontes de nitrogênio, pH e agitação.....	30
<u>4.3 Caracterização bioquímica de lipase produzida por <i>P. janthinellum</i></u>	34
4.3.1 Determinação do pH ótimo de atividade.....	34
4.3.2 Determinação da temperatura ótima de atividade.....	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas, capazes de acelerar uma reação metabólica através de seu poder de catálise, o qual é essencial para a manutenção da vida em uma escala de tempo útil (NELSON e COX, 2011). Com o rápido desenvolvimento da enzimologia e aumento da demanda de enzimas específicas para usos comerciais, surgiu o mercado industrial de enzimas, no qual as mais comercializadas são proteases, carboidrases e lipases, sendo utilizadas, principalmente, na indústria alimentícia, de ração animal e de detergentes (VOCUS, 2011).

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma importante classe de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis. Seus substratos naturais são triacilgliceróis de cadeia longa, com baixa solubilidade em água, o que confere às lipases a característica de catálise em uma interface óleo/água (GUPTA et al., 2003). O fato de hidrolisarem substratos insolúveis em água as distingue das esterases, enzimas que também catalisam a hidrólise de ligações éster, porém em substratos solúveis (FOJAN et al., 2000). Encontradas em, virtualmente, todos os seres vivos, as lipases microbianas estão se destacando no cenário industrial atual devido ao seu grande espectro de aplicação, o qual pode ser relacionado às suas diversas funções. Além de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa (**Figura 1**), em meios orgânicos com pouca água, as lipases são capazes de catalisar a reação inversa, isto é, podem esterificar ácidos graxos e glicerol a triacilgliceróis, bem como atuar em reações de transesterificação, entre outras (GOSH et al., 1996; REETZ, 2002). As diversas reações catalisadas por lipases encontram-se na **Figura 2**.

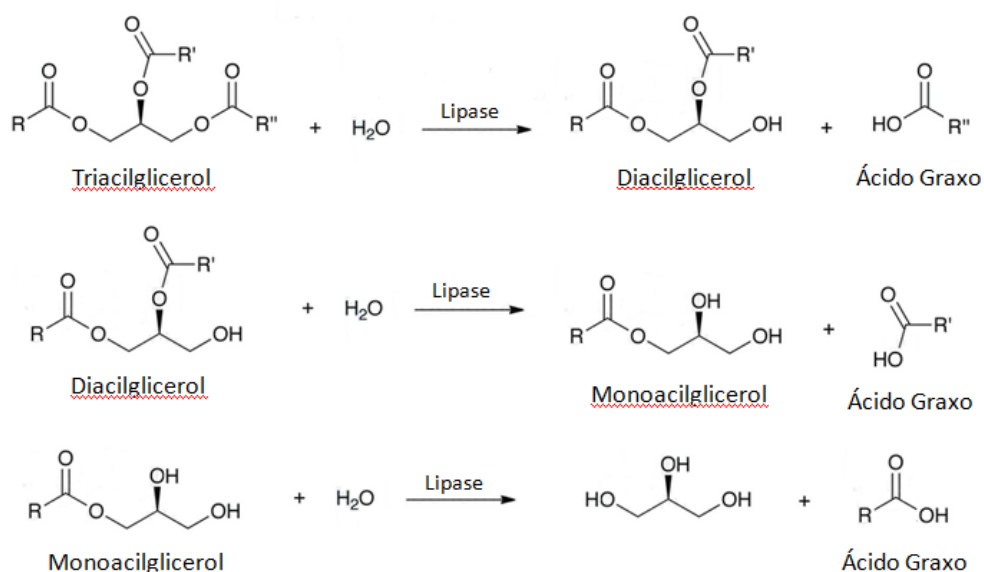


Figura 1 – Hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipase. Fonte: adaptado de Worthington Biochem. Co. Acesso em 04 out. 2012.

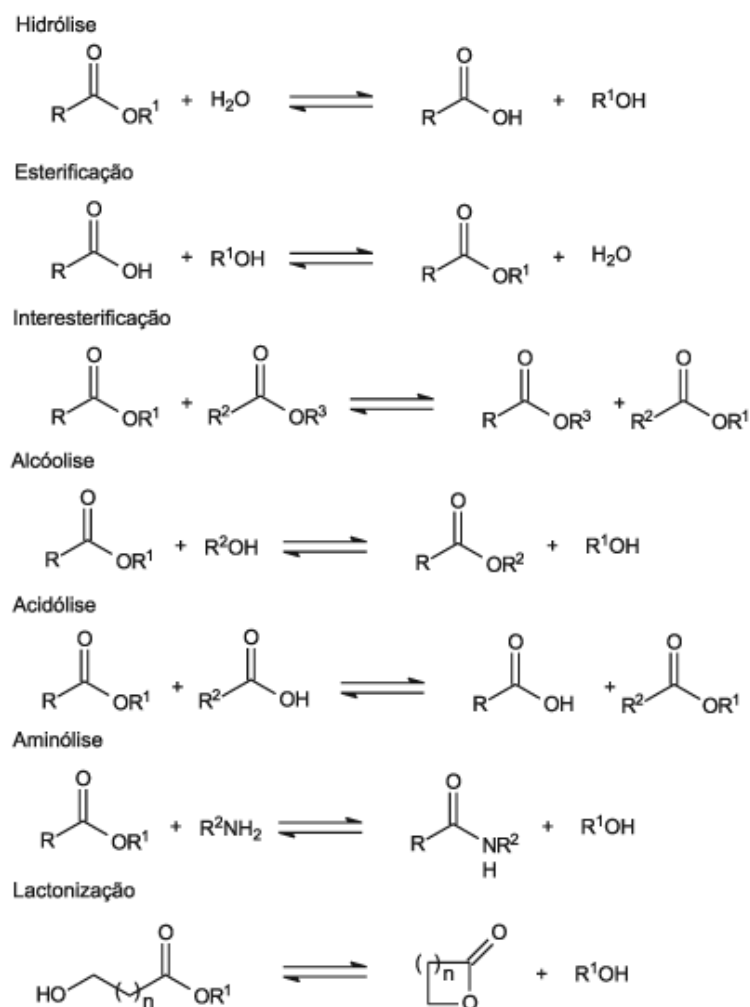


Figura 2 – Reações catalisadas por lipases (PAQUES e MACEDO, 2006).

Estas enzimas são únicas em seu modo ação, pois atuam na hidrólise das ligações ésteres dos triacilgliceróis na interface óleo/água. Este fenômeno é conhecido como ativação interfacial e foi originalmente detectado em estudos de lipase pancreática suína, sendo atribuído a uma mudança conformacional durante o processo de catálise (NOINVILLE et al., 2002). Tal fenômeno ocorre devido à estrutura espacial das lipases, as quais possuem uma unidade oligopeptídica helicoidal anfipática que protege o sítio ativo, comumente composto por uma tríade catalítica formada por serina, aspartato e histidina. Quando em contato com uma interface polar/apolar, esta unidade realiza um movimento que expõe o sítio ativo ao substrato, possibilitando a catálise (REETZ, 2002; HOU e SHIMADA, 2009). Entretanto, nem todas as lipases são dotadas de ativação interfacial. Por exemplo, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida antarctica* B não possuem esse escudo anfipático que protege o sítio ativo, impossibilitando a mudança conformacional responsável pelo fenômeno da ativação interfacial. Assim, estas enzimas são consideradas intermediárias entre lipases e esterases. (HOU e SHIMADA, 2009).

A maioria das lipases de interesse industrial é produzida por micro-organismos, dentre os quais se destacam fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SHARMA et al., 2001). Quanto aos fungos filamentosos, os principais gêneros que produzem lipases de importância comercial são *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor*, cultivados, na maioria das vezes, em fermentações em estado sólido. Dentre as leveduras, o gênero *Candida* apresenta-se como principal produtor, porém, os gêneros *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Williopsis* também são descritos na literatura como produtores de lipase. Já, no caso das bactérias, os principais gêneros descritos são *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia* e *Acinetobacter*. Os cultivos de leveduras e bactérias, visando à produção de lipase, são, na maioria das vezes, realizados em fermentações submersas (TREICHEL et al., 2010).

A produção de lipase extracelular por fungos filamentosos do gênero *Penicillium* foi extensamente estudada, por apresentar-se como bom produtor desta enzima, sendo algumas lipases de *Penicillium* já comercializadas. Mais de 30 espécies de *Penicillium* são descritas na literatura como produtoras de lipase, dentre as quais as mais estudadas são *P. aurantiogriseum*, *P. camembertii*, *P. caseicolum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. restrictum* e *P. simplicissimum* (LI e ZONG, 2010).

A produção de enzimas microbianas é realizada por fermentação submersa ou por fermentação em estado sólido. A fermentação submersa tornou-se um modelo para a obtenção de produtos fermentados desde a Segunda Guerra Mundial, quando se constatou o aumento da produção de penicilina por este método. Atualmente, a produção de muitas enzimas é feita por fermentação submersa, sendo este um processo dominante no cenário industrial. Porém, a fermentação em estado sólido também é amplamente utilizada, sendo que nesta as vantagens são maior produtividade na fermentação, maior concentração e estabilidade final do produto e menor ocorrência de repressão catabólica (LI e ZONG, 2010). Singh e Mukhopadhyay (2012) descrevem a produção de lipases por diversos fungos, sendo apenas a produção por espécies de *Penicillium* apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Produção de lipase através de fermentação por algumas espécies de *Penicillium*.

Espécie	Tempo (h)	Tipo de fermentação	Susbtrato	Atividade Lipase
<i>P. aurantiogriseum</i>	48	FS	Óleo de soja	25 U/mL
<i>P. restrictum</i>	24	FES	Bagaço de babaçu	30 U/g
<i>P. simplicissimum</i>	36	FES	Bagaço de babaçu	30 U/g
<i>P. simplicissimum</i>	48	FES	Bagaço de Soja	21 U/g
<i>P. verrucosum</i>	48	FES	Farelo de Soja	40 U/g
<i>P. chrysogenum</i>	168	FES	Farelo de Trigo	46 U/g

(FS) – Fermentação Submersa; (FES) – Fermentação em Estado Sólido. Modificado de Singh e Mukhopadhyay (2012).

Considerando que o ambiente influencia decisivamente a morfologia, o crescimento e a fisiologia dos micro-organismos, a produção de lipase é fortemente influenciada pela composição do meio de cultura e pelas condições físico-químicas nas quais estes são submetidos (COLIN et al., 2010). As fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações são fatores importantes na produção de lipase. Em geral, óleos vegetais apresentam-se como as melhores fontes de carbono para este

fim, destacando-se o azeite de oliva, utilizado em concentrações tão baixas quanto 0,5%, como demonstrado por Lima et al. (2003). Porém, Açikel et al. (2010) demonstraram que óleo de girassol a uma concentração de 1,1% resultou em melhor produção, e Gulati et al. (1999) obtiveram melhor produção de lipase utilizando óleo de milho a 2,0%. Quanto às fontes de nitrogênio, fontes orgânicas, como peptonas, extrato de levedura e caseína, apresentaram melhor desempenho na produção de lipase quando comparadas com fontes inorgânicas, como nitrato de sódio, nitrato de amônio e cloreto de amônio (LIMA et al., 2003; GULATI et al., 1999; SARKAR et al., 1998; AÇIKEL et al., 2010). A temperatura, a agitação e o pH do meio de cultivo também são fatores importantes, com as melhores condições variando consideravelmente entre os micro-organismos, sendo a otimização desses fatores essencial para uma boa produção de lipase. Além de se conhecer as condições ideais para a produção desta enzima, as características bioquímicas das diferentes lipases produzidas pelos micro-organismos também devem ser estudadas, a fim de empregá-las eficientemente nos diferentes processos industriais.

Várias lipases produzidas por *Penicillium* foram caracterizadas e apresentaram propriedades bioquímicas distintas. Dentre as descritas, a massa molecular varia entre 28 e 43 kDa, com exceção da lipase de *P. cyclopium* que apresentou massa molecular de 93 kDa. O ponto isoelétrico, determinado para lipases de algumas espécies, varia entre 3,4 e 7,2. O pH ótimo de atividade, geralmente, varia entre 7,0 e 10,0, porém *P. chrysogenum* 9' apresentou atividade ótima em pH 5,0. Quanto à temperatura ótima a faixa é ampla, variando de 25°C a 60°C (LI e ZONG, 2010). Em geral, as lipases de *Penicillium*, não necessitam de co-fatores para a atividade catalítica, porém a presença de íons divalentes no meio, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , por vezes estimulam a atividade (RUIZ et al., 2001; BANCERZ et al., 2005). O gênero *Penicillium* também apresenta lipases estáveis em solventes orgânicos apolares, como hexano, n-heptano e iso-octano, com atividade residual de mais de 90% após incubação a 28°C por 1 hora. Porém, pouca ou nenhuma atividade foi relatada em solventes polares, como metanol, etanol, propanol, acetona e butanol (LI e ZONG, 2010). A **Tabela 2**, adaptada de Li e Zong (2010), apresenta algumas características físico-químicas das lipases de espécies de *Penicillium* estudadas.

Tabela 2 – Características físico-químicas das lipases produzidas por espécies de *Penicillium*.

Espécie	Massa Molecular (kDa)	pI	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)
<i>P. abeanum</i>	28	3,4	7,0 – 8,0	25 – 30
<i>P. camembertii</i>	28,18	-	8,0	48
<i>P. candidum</i>	29	5,5	9,0	35
<i>P. citrinum</i>	33	4,8 – 5,0	8,0	45
<i>P. chrysogenum</i>	40	3,8	7,9 – 8,1	45
<i>P. cyclopium</i>	93	5,2	7,0	37
<i>P. expansum</i>	25	5,5	9,0	45
<i>P. roqueforti</i>	25	7,2	6,0 – 7,0	35

Fonte: Modificada de Li e Zong (2010).

As lipases microbianas são amplamente empregadas em processos industriais e biotecnológicos. Como aditivo em detergentes, as lipases contribuem para diminuição do uso de produtos químicos, sendo biodegradáveis, atóxicas e seus resíduos inofensivos (HASAN et al., 2010). Na produção e refinamento de oleoquímicos, as lipases são aplicadas eficientemente, por liberarem ácidos graxos e glicerol a partir de lipídios (IBRAHIM, 2008). Na indústria alimentícia, as lipases são aplicadas para realçar o sabor de laticínios e no processamento de carnes, vegetais, frutas e cervejas, ou ainda utilizadas para redução calórica dos lipídios, através de transesterificação de ácidos graxos (ARAVINDAM et al., 2007; HOUDE et al., 2004). As lipases podem também ser aplicadas na manufatura do couro, em substituição aos solventes químicos utilizados para remoção de lipídios. Nas indústrias farmacêutica e cosmética, as lipases são utilizadas para obtenção de mono-, di- e triglicerídeos que podem atuar como corantes, perfumes, protetores solar, aditivos de maquiagens, entre outros (GANDHI, 1997).

Esta ampla gama de aplicação das lipases, a qual gera grande demanda industrial, motiva a busca por novas fontes de lipases com características distintas, como lipases com estabilidades diferentes em condições físicas e químicas,

tornando necessário assim o isolamento e seleção de novos micro-organismos produtores, bem como estudos sobre otimização de sua produção, purificação e aplicação (TREICHEL et al., 2010).

A linhagem de *Penicillium janthinellum* estudada foi isolada de solo de Mata Atlântica, da região conhecida como Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil (RUEGGER, 2001), e mostrou-se boa produtora de lipases em triagem previamente realizada (ALMEIDA, 2011). Cultivado em meio sólido aveia-ágar, seu micélio apresenta coloração branca até, aproximadamente, o terceiro dia de cultivo, quando começa a esporular, passando a apresentar coloração esverdeada após este período. A **Figura 3** mostra um conidióforo de *P. janthinellum* com oito dias de idade, em imagem obtida através de microscopia óptica.

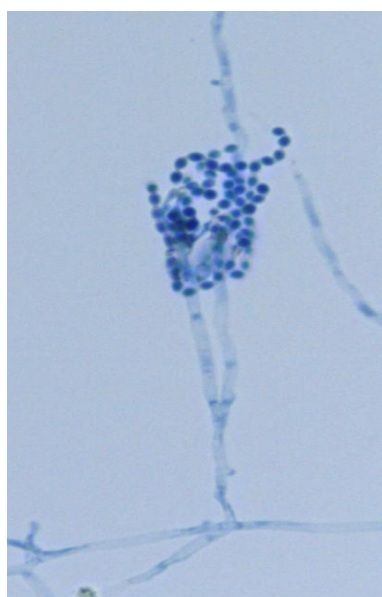


Figura 3 – Conidióforo de *P. janthinellum* cultivado em meio sólido aveia-ágar por 8 dias. Microscopia óptica; coloração: lactofenol; aumento: 400X. Fonte: Elaborado pela autora.

O estudo da produção de lipase por *P. janthinellum* é inédito e foi motivado pela crescente demanda industrial por novas fontes de lipases com características distintas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a influência de alguns fatores nutricionais e parâmetros físico-químicos na produção de lipase extracelular pelo fungo filamentoso *Penicillium janthinellum*, em meio de cultura líquido, selecionando as melhores condições para a produção dessa enzima por este fungo, bem como caracterizar esta atividade quanto ao seu pH e temperatura ótimos de catálise.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes meios de cultivo sobre a produção de lipase;
- Avaliar se a produção de lipase por *P. janthinellum* é constitutiva ou induzida por ácidos graxos e triacilgliceróis;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de carbono puras e complexas, de origens vegetal e animal, e de suas concentrações sobre a produção de lipase;
- Avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio;
- Avaliar o efeito dos parâmetros pH, agitação e temperatura, sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*;
- Caracterizar o extrato bruto, obtido condições que apresentaram maior produção desta enzima, quanto ao pH ótimo e temperatura ótima de catálise.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Manutenção e cultivo da linhagem

A linhagem de *Penicillium janthinellum* foi mantida em meio sólido aveia-ágar, a partir de repiques periódicos mantidos a 28°C por cinco dias. Após este período, ela foi utilizada para cultivo em meio líquido ou armazenada a 4°C. Os meios foram preparados, autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos, distribuídos em tubos de ensaio e inclinados.

Para o cultivo em meio líquido, conídios de cinco dias de idade foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a concentração ajustada para 10^7 conídios/mL a partir de contagem em Câmara de Neubauer. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio de cultura.

Um microcultivo em lâmina foi realizado para visualização das estruturas microscópicas de *P. janthinellum*, utilizando-se meio sólido aveia-ágar e incubação por 8 dias. A lâmina contendo o fungo foi corada com lactofenol, visualizada em aumento de 400 vezes através de microscópio Leica ICC50HD e fotografada em computador com o programa Leica Application Suite V 4.0.

3.2 Seleção do meio de cultura

Para o cultivo da linhagem de *P. janthinellum*, quatro meios de cultura, citados na literatura para o desenvolvimento de fungos do gênero *Penicillium* visando a produção de lipase, foram testados. O meio que apresentou melhor atividade lipolítica foi selecionado. Os meios testados foram:

Meio de cultivo 1: (m/v) azeite de oliva 1,0%, peptona de carne 2,0%, cloreto de sódio (NaCl) 0,5% e extrato de levedura 0,1% (FREIRE et al., 1997);

Meio de cultivo 2: (g/L) bacto-peptona, 5,0; extrato de levedura, 1,0; nitrato de sódio (NaNO_3), 0,5; cloreto de potássio (KCl), 0,5; sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5; fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4), 2,0 e azeite de oliva, 10,0 (DHEEMAN et al., 2011);

Meio de cultivo 3: meio de vogel (VOGEL, 1956), contendo azeite de oliva 1,0% (v/v) como fonte de carbono (modificado como ALMEIDA, 2012);

Meio de cultivo 4: (m/v) azeite de oliva 1,0%, extrato de levedura 0,5%, nitrato de amônio (NH_4NO_3) 0,2%, sulfato de magnésio (MgSO_4) 0,05%, fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) 0,55%, fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) 1,5%, cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01% e cloreto de sódio (NaCl) 0,01% (LIMA et al., 2003).

O pH de todos os meios foi ajustado para 5,5 e a incubação foi realizada a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante cinco dias. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.3 Efeito de fatores físico-químicos sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*

As melhores condições de cultivo para a produção de lipase extracelular por *P. janthinellum* foram selecionadas a partir da verificação do efeito de alguns parâmetros físico-químicos dos meios de cultivo líquidos. Os fatores analisados incluíram: tempo de cultivo, fontes de carbono puras e complexas de origens animal e vegetal, fontes de nitrogênio, pH, agitação e temperatura.

3.3.1 Influência do tempo de cultivo sobre o crescimento fúngico e produção de lipase

A análise do tempo de cultivo foi realizada utilizando-se o meio de cultura selecionado no item 3.2. Os cultivos foram realizados por um tempo total de sete dias (168h), com coletas de amostra a cada 24h, para avaliar o crescimento e a produção de lipase. O pH do meio foi ajustado para 5,5 e a incubação foi realizada a 28°C, sob agitação de 160 rpm. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.3.2 Influência das fontes de carbono

Fontes de carbono puras, como carboidratos, alcoóis, ácidos orgânicos, triacilgliceróis e ácidos graxos, e fontes de carbono complexas, como óleos vegetais e gorduras animais foram analisadas utilizando-se o meio de cultivo e período de tempo selecionados nos itens **3.2** e **3.3.1**.

As fontes de carbono puras, glicose, lactose, glicerol, ácido cítrico, tributirina, trioleína, trioctanoato, ácido láurico, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico, foram avaliadas individualmente na concentração de 1,0% (m/v). Os ácidos graxos foram emulsionados com adição de 0,1% de Tween 80 (m/v) e agitação vigorosa por 5 minutos, para se obter uma mistura mais homogênea.

Quanto às fontes de carbono complexas, foram analisadas: azeite de oliva, azeite de dendê, óleo de soja, óleo de girassol, óleo de rícino, óleo de linhaça bruto, óleo de canola, óleo de milho, gordura de frango, sebo bovino e banha suína na concentração de 1,0% (m/v). Sebo bovino e banha suína também foram emulsionados de maneira semelhante aos ácidos graxos, conforme descrito anteriormente.

Um cultivo sem adição de fonte de carbono foi realizado como controle.

Em todos os cultivos, o pH do meio foi ajustado para 5,5 e a incubação foi realizada a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante três dias. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.3.3 Influência da concentração da fonte de carbono

A melhor fonte de carbono selecionada em **3.3.2** foi analisada nas concentrações de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0% (m/v). O pH do meio foi ajustado para 5,5 e a incubação foi realizada a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante três dias. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.3.4 Influência da temperatura de cultivo

Os cultivos foram realizados nas temperaturas de 24, 26, 28, 30 e 32°C, com os demais parâmetros fixados conforme selecionado nos itens anteriores, por um período de incubação de três dias. Os cultivos foram realizados em triplicata.

3.3.5 Influência das fontes de nitrogênio, pH e agitação do cultivo

Para a avaliação da influência das concentrações das fontes de nitrogênio, pH e agitação na produção de lipase por *P. janthinellum* realizou-se por um planejamento experimental fatorial fracionado com cinco variáveis (2^{5-1}). Os cultivos foram realizados a 28°C por três dias.

3.4 Caracterização bioquímica de lipase produzida por *P. janthinellum*

3.4.1 Determinação do pH ótimo de atividade

O pH ótimo de atividade foi determinado através da quantificação da atividade enzimática na faixa de pH de 3,0 a 8,0, utilizando-se tampão McIlvaine para o preparo do meio reacional.

3.4.2 Determinação da temperatura ótima de atividade

A temperatura ótima de atividade foi determinada através da quantificação da atividade enzimática em temperaturas de incubação que variaram de 30 a 80°C, com intervalos de 5°C, no pH ótimo determinado no item **3.4.1**.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Avaliação do crescimento fúngico

O crescimento fúngico foi avaliado a determinando-se a biomassa seca. As amostras foram filtradas em filtro de papel e o micélio retido foi seco em estufa a 105°C até peso constante.

3.5.2 Determinação da atividade lipase

A atividade lipase foi determinada de acordo com Yang et al. (2002), utilizando-se o substrato sintético para-nitrofenil palmitato (pNPP). A hidrólise do pNPP foi determinada após 1 e 2 minutos de reação, a 37 °C, acompanhando-se a liberação do íon p-nitrofenol. O meio reacional utilizado constituiu-se de 3,8 mg de pNPP solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e, então, diluído a 0,5 mM com tampão McIlvaine 0,05 M pH 7,0, contendo 0,5% de Triton X-100. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL do filtrado de cultura, diluído convenientemente, a 900 µL de meio reacional, mantido a 37 °C. A reação foi interrompida pela imersão em banho-maria a 90 °C por 1 minuto, seguida pela adição de 1,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. O branco da reação correspondeu ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionado de 100 µL de tampão McIlvaine pH 7,0 ao invés da amostra. O p-nitrofenol liberado foi determinado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de p-nitrofenol por mililitro por minuto de reação. Os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicatas. Nas condições do ensaio, o valor da absortividade molar do p-nitrofenol (ϵ) foi de 18033 cm⁻¹.M⁻¹.

3.5.3 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford modificado (SEDMAN e GROSSBERG, 1977), com soroalbumina bovina como padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção do meio de cultura

A composição do meio de cultura afetou drasticamente o crescimento microbiano e a produção enzimática. Na **Tabela 3** são apresentados os resultados de biomassa, atividade lipase por unidade de volume e atividade específica, obtidos a partir do cultivo de *Penicillium janthinellum* nos quatro meios de cultura avaliados para a produção de lipase.

Tabela 3 – Crescimento e produção de lipase por *P. janthinellum* cultivado em diferentes meios de cultura.

Meios de Cultivo	Biomassa Seca (g)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/ µg prot.)
1	0,067	ND	0,000
2	0,173	0,476	0,293
3	0,060	ND	0,000
4	0,067	ND	0,000

ND – Atividade não detectada. Cultivo realizado em pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante 5 dias.

Todos os meios de cultivo avaliados possibilitaram o crescimento de *Penicillium janthinellum*, porém a produção de lipase foi detectada apenas no meio 2. Neste meio, Dheeman et al. (2011) obtiveram uma produção de lipase de 3,25 U/mL por uma linhagem de *Penicillium* sp. (DS-39). A produção de lipase tem sido relacionada à presença de nutrientes orgânicos, como peptonas e extrato de levedura, os quais estão presentes em quantidades majoritárias neste meio (GULATI et al., 1999).

Freire et al. (1997) observaram produção de lipase de 13,0 U/mL por *P. restrictum* utilizando o meio 1, porém para esta linhagem de *P. janthinellum* os nutrientes fornecidos por este meio não foram suficientes ou adequados para a produção de lipase, provavelmente devido a concentração mais baixa de fontes orgânicas em comparação ao meio 2, o qual contém bactopectona, além de extrato de levedura. O meio de Vogel (meio 3) é amplamente utilizado para o cultivo de fungos filamentosos, porém é composto majoritariamente por nutrientes inorgânicos,

não sendo observada a produção de lipase por este fungo. Lima et al. (2003) observaram produção inicial de lipase de 0,4 U/mL por *P. aurantiogriseum* utilizando o meio 4, e atividade de 25 U/mL após otimização das condições de cultivo. Porém, esta linhagem mostrou-se singular por apresentar produção de lipase em um meio predominantemente inorgânico (LIMA et al., 2003).

Em outros estudos, a composição do meio de cultivo foi avaliada para melhorar a produção de lipase controlando-se as condições de cultura e modificando-se os componentes do meio de cultivo, como, por exemplo, estudos de Lin et al. (2006), no qual estes autores aumentaram em quase 11 vezes a produção de lipase por *Antrodia cinnamomea*; Colin et al. (2010) aumentaram em 6,6 vezes a atividade específica de lipase de *Aspergillus niger* e Kumar et al. (2005) observaram aumento de 2 vezes na produtividade de lipase de *Bacillus coagulans* quando os componentes do meio de cultivo foram alterados.

Assim, o meio 2 foi selecionado para estudos da influência dos demais parâmetros físico-químicos sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*.

4.2 Efeito de fatores físico-químicos sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*

4.2.1 Influência do tempo de cultivo sobre o crescimento fúngico e produção de lipase

O crescimento microbiano pode ser analisado através de parâmetros como número total de células, número de colônias em populações viáveis ou quantificação da biomassa. No caso de micro-organismos filamentosos, como *P. janthinellum*, o crescimento é comumente avaliado pela determinação da biomassa seca. Em cultivos realizados em batelada, o crescimento pode ser plotado em uma curva típica, dividida em quatro fases: fase de latência ou fase “lag”, na qual os micro-organismos estão se adaptando ao meio; fase exponencial ou logarítmica, em que as taxas de crescimento e divisão são as mais elevadas possíveis; fase estacionária, na qual a escassez de nutrientes limita o crescimento; e fase de declínio ou fase de morte, na qual a privação de novos nutrientes e acúmulo de metabólitos tóxicos impedem o crescimento e induzem a morte dos micro-organismos (PRESCOTT et al., 2002; MADIGAN et al., 2010).

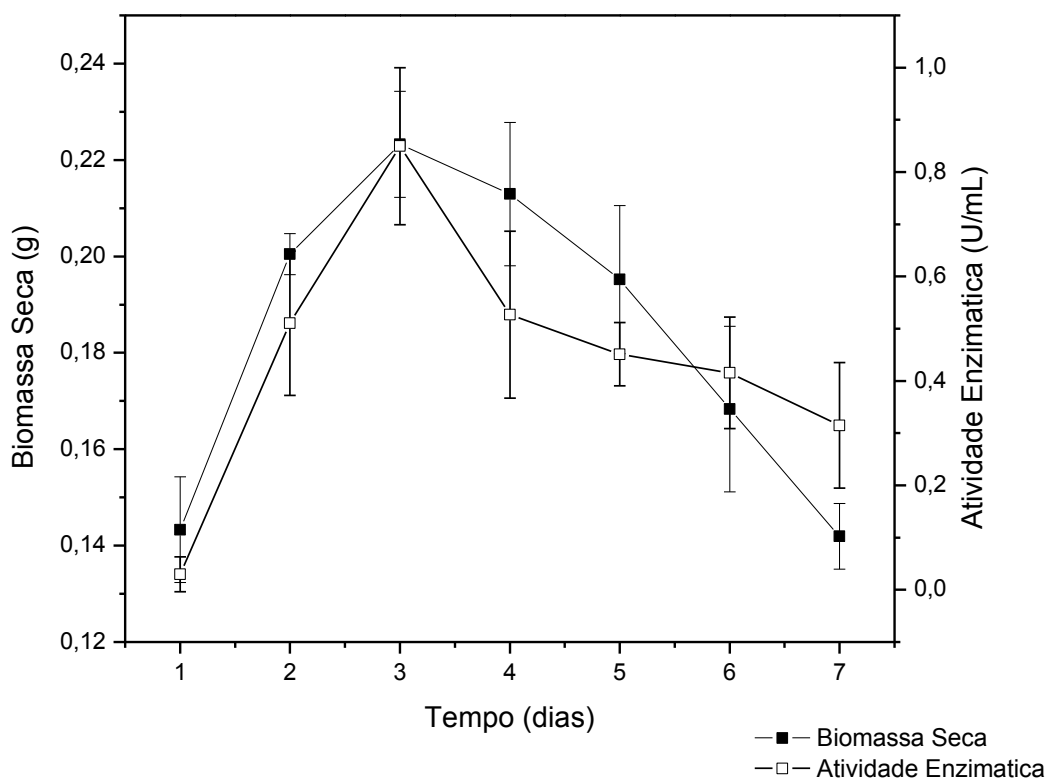


Figura 4 – Crescimento e produção de lipase por *P. janthinellum*. Cultivo realizado em meio líquido, pH 5,5 a 28°C e sob agitação de 160 rpm. (■) Biomassa Seca (g); (□) Atividade Enzimática (U/mL).

A partir da observação da **Figura 4**, a qual relaciona o tempo de cultivo com o crescimento e a produção de lipase (atividade enzimática), é possível verificar que a maior produção desta enzima ($0,849 \pm 0,15$ U/mL) se deu no final da fase exponencial de crescimento (72h). Este resultado é semelhante a outros observados na literatura, como os de Dheeman et al. (2011), que observaram maior atividade lipase também no final da fase exponencial de crescimento para uma linhagem de *Penicillium* sp. DS-39 (3,25 U/mL em 120h).

As fases de crescimento não podem ser facilmente visualizadas na **figura 4**, provavelmente pelo fato das coletas terem sido realizadas em intervalos longos (24h). Curvas típicas geralmente são construídas com avaliações em intervalos menores.

A **Tabela 4** mostra os resultados obtidos com o cultivo em batelada de *P. janthinellum*. Neste caso, é possível observar que a produção de lipase acompanhou o crescimento, sendo o pico de produção coincidente com o pico de biomassa.

Tabela 4 – Crescimento e produção de lipase por *P. janthinellum* em função do tempo de cultivo.

Tempo de Cultivo (dias)	Biomassa Seca (g)	Atividade Enzimática Total (U)	Atividade Específica (U/ µg prot.)	Y _{P/X} (U/g)
1	0,143 ± 0,01	0,704 ± 0,03	0,080 ± 0,01	4,920
2	0,200 ± 0,00	10,042 ± 0,13	1,119 ± 0,04	50,208
3	0,223 ± 0,01	16,779 ± 0,15	1,486 ± 0,06	75,241
4	0,213 ± 0,01	10,364 ± 0,15	0,963 ± 0,05	48,658
5	0,195 ± 0,01	8,721 ± 0,06	1,206 ± 0,05	44,725
6	0,168 ± 0,01	8,003 ± 0,10	0,816 ± 0,03	47,634
7	0,142 ± 0,00	6,770 ± 0,12	0,431 ± 0,09	47,676

Y_{P/X} – Rendimento por biomassa seca. Cultivo realizado em pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm.

A produção enzimática comportou-se de maneira semelhante à produção de biomassa, sendo crescentes até o terceiro dia, quando apresentaram pico, e decrescentes a partir deste dia até o sétimo dia. Atividade específica e rendimento por biomassa apresentaram padrões ligeiramente diferentes, sendo também crescentes até o terceiro dia e decrescentes após este período, porém a atividade específica apresentou novo pico no quinto dia, enquanto o rendimento em biomassa apresentou queda mais acentuada neste mesmo dia.

As quedas no crescimento podem estar relacionadas à escassez de nutrientes e/ou ao acúmulo de metabólitos tóxicos, e a diminuição da atividade enzimática pode estar relacionada à liberação de maiores quantidades de enzimas proteolíticas nas fases estacionária e de morte (PRESCOTT et al., 2002).

Levando-se em consideração que a maior produção de lipase foi observada em 72 horas de cultivo, este tempo foi selecionado para os experimentos subsequentes.

4.2.2 Influência das fontes de carbono

A produção de lipase depende, em grande parte, da composição do meio de cultura e da fonte de carbono que influencia decisivamente nesta produção, uma vez

que as lipases são capazes de catalisar uma ampla gama de substratos (LIN et al., 2006; DALMAU et al., 2000).

Para avaliar a produção de lipase por *P. janthinellum* diferentes fontes de carbono puras e complexas foram adicionadas individualmente ao meio de cultivo na concentração de 1% (m/v), em substituição ao azeite de oliva.

A **Tabela 5** apresenta os resultados referentes à adição de fontes de carbono puras ao meio de cultura.

Tabela 5 – Crescimento e produção de lipase por *P. janthinellum* cultivado em diferentes fontes de carbono puras.

Fonte de Carbono (1% m/v)	Biomassa Seca (g)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/ μ g prot.)	$Y_{P/X}$ (U/g)	P_L (U/h)
<i>Carboidratos</i>					
Glicose	0,045 $\pm$ 0,00	0,018 $\pm$ 0,01	0,013 $\pm$ 0,13	9,026	0,005
Lactose	0,021 $\pm$ 0,00	0,019 $\pm$ 0,01	0,014 $\pm$ 0,00	21,183	0,006
<i>Álcool</i>					
Glicerol	0,096 $\pm$ 0,01	0,001 $\pm$ 0,00	0,001 $\pm$ 0,04	0,265	0,0003
<i>Triacilgliceróis</i>					
Tributirina	0,056 $\pm$ 0,00	0,030 $\pm$ 0,01	0,026 $\pm$ 0,05	128,168	0,010
Trioleína	0,218 $\pm$ 0,01	0,074 $\pm$ 0,03	0,054 $\pm$ 0,06	6,749	0,020
Trioctanoato	0,123 $\pm$ 0,03	0,003 $\pm$ 0,00	0,002 $\pm$ 0,03	0,508	0,0008
<i>Ácido Orgânico</i>					
Ácido Cítrico	0,021 $\pm$ 0,00	ND	0,000	0,000	0,000
<i>Ácidos Graxos*</i>					
Ácido Láurico	0,079 $\pm$ 0,04	0,032 $\pm$ 0,03	0,013 $\pm$ 0,13	7,570	0,008
Ácido Mirístico	0,105 $\pm$ 0,03	0,115 $\pm$ 0,03	0,058 $\pm$ 0,18	19,651	0,029
Ácido Palmítico	0,094 $\pm$ 0,00	0,294 $\pm$ 0,19	0,150 $\pm$ 0,16	56,660	0,074
Ácido Esteárico	0,244 $\pm$ 0,01	0,585 $\pm$ 0,04	0,265 $\pm$ 0,04	43,998	0,149
Ácido Oleico	0,203 $\pm$ 0,00	0,133 $\pm$ 0,02	0,076 $\pm$ 0,03	13,864	0,039
Ácido Linoléico	0,104 $\pm$ 0,02	0,107 $\pm$ 0,01	0,078 $\pm$ 0,09	23,870	0,034
Sem Adição	0,019 $\pm$ 0,00	0,038 $\pm$ 0,02	0,029 $\pm$ 0,01	45,413	0,012

$Y_{P/X}$ – Rendimento por biomassa seca. P_L – Produtividade de lipase. ND – Atividade não detectada. Cultivo realizado em pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante 3 dias.

*Adição de 0,1% (m/v) Tween 80.

Quanto às fontes de carbono puras, foi possível observar maior produção enzimática quando o ácido esteárico foi adicionado ao meio, seguido de ácido palmítico, ácido oleico, ácido mirístico, ácido linoleico e trioleína. Nos meios contendo outras fontes de carbono, como glicose, lactose, glicerol e ácido cítrico, foram verificados baixos níveis de atividade enzimática, ou não foi detectada atividade enzimática nas condições do ensaio.

Considerando que a atividade lipase em meio contendo ácido esteárico ($0,585 \pm 0,04 \text{ U/mL}$) foi 15 vezes maior que a atividade em meio sem adição de fonte de carbono pura ($0,038 \pm 0,02 \text{ U/mL}$) e 32,5 vezes maior que aquela observada em meio com glicose ($0,018 \pm 0,01$), é possível concluir que a produção de lipase por *P. janthinellum* é indutível, assim como a produção da maioria das lipases microbianas. Alguns indutores citados na literatura para produção de lipase por fungos e bactérias são triglicerídeos, ácidos graxos, sais biliares e glicerol, porém, em geral, compostos lipídicos apresentam-se como os melhores indutores para produção desta enzima (GOSH et al., 1996).

A atividade lipase obtida quando o meio não foi adicionado de fonte de carbono pura ($0,038 \pm 0,02 \text{ U/mL}$) foi superior àquela obtida com glicose ($0,018 \pm 0,01 \text{ U/mL}$) e lactose ($0,019 \pm 0,01 \text{ U/mL}$), indicando que a produção de lipase por *P. janthinellum* pode também estar sujeita à repressão catabólica. Esta diminuição está de acordo com o observado na literatura para lipases de alguns micro-organismos, nos quais repressão catabólica induzida por glicose é amplamente estudada, sendo relacionada a mudanças no controle da expressão gênica (DALMAU et al., 2000; YANG et al., 2002). Dalmau et al. (2000) também verificaram baixa produção de lipase por *Candida rugosa* em meios contendo glicose, porém para outros micro-organismos, como *Antrodia cinnamomea* a presença de glicose é importante para uma boa produção desta enzima (LIN et al., 2006).

A produção de lipase variou consideravelmente dentre os triacilgliceróis testados. Tributirina ($0,030 \pm 0,01 \text{ U/mL}$) e trioctanoato ($0,003 \pm 0,00 \text{ U/mL}$) também apresentaram atividades inferiores ao meio com ausência de fonte de carbono pura, provavelmente por serem constituídos por ácidos graxos saturados de cadeia curta, de quatro e oito carbonos, respectivamente; enquanto trioleína induziu maior atividade ($0,074 \pm 0,03 \text{ U/mL}$), provavelmente por ser constituída por ácidos graxos de cadeia longa (18 carbonos), contudo insaturados. Estes resultados permitem

inferir que a lipase em questão é induzida preferencialmente por substratos com cadeias de carbono longas, sendo estes seus melhores indutores.

A indução por substratos constituídos por cadeias longas de carbono é confirmada pelos resultados obtidos com os ácidos graxos. Pôde-se observar maior atividade enzimática com o aumento da cadeia carbônica, sendo possível ainda verificar maior indução com ácidos graxos saturados. A **Figura 5** mostra esta relação entre atividade enzimática, comprimento da cadeia carbônica e grau de insaturação. O ácido láurico (C12:0) é o ácido graxo saturado com a menor cadeia carbônica dentre os avaliados e foi o que induziu menor atividade de lipase ($0,032 \pm 0,03$ U/mL). Em adição, o ácido graxo saturado que induziu maior atividade enzimática ($0,585 \pm 0,04$ U/mL), o ácido esteárico (C18:0), apresenta a maior cadeia carbônica dentre os avaliados. Quanto à presença de insaturações, a lipase em questão foi produzida em maior nível em meio contendo o ácido graxo com o menor número de insaturações na cadeia carbônica. Em ordem crescente de atividade apresentam-se: ácido linoleico ($0,107 \pm 0,01$ U/mL), com 18 carbonos e duas insaturações; ácido oléico ($0,133 \pm 0,02$ U/mL), também com 18 carbonos e uma insaturação; e ácido esteárico ($0,585 \pm 0,04$ U/mL), ácido graxo saturado com 18 carbonos.

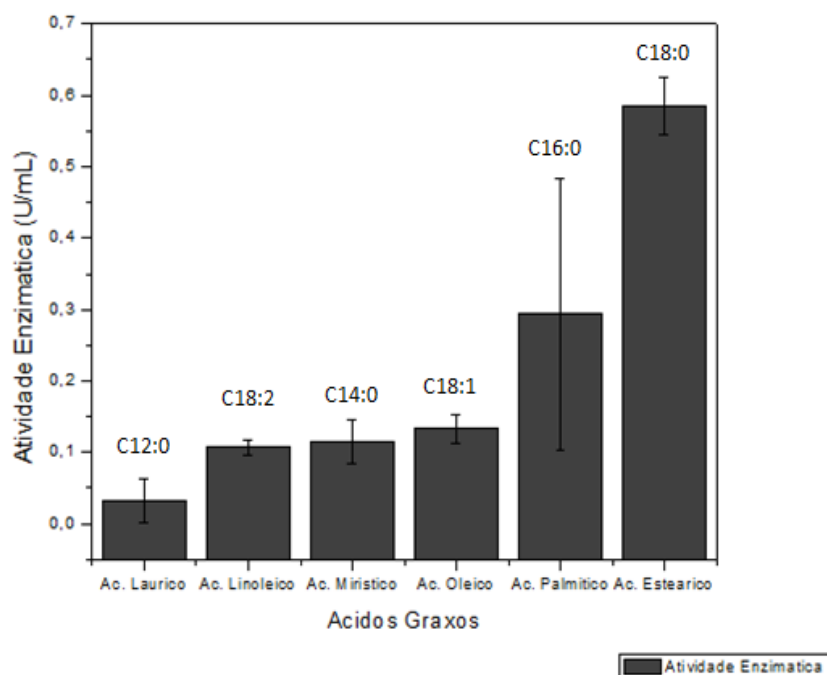


Figura 5 – Relação entre atividade enzimática, comprimento da cadeia carbônica e grau de insaturação sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*. CX:Y representa o comprimento da cadeia carbônica e o grau de insaturação, onde X corresponde ao número de carbonos da cadeia e Y ao número de insaturações.

De uma maneira geral, as fontes de carbono complexas mostraram-se mais eficientes na produção de lipase quando comparadas às fontes de carbono puras (**Tabela 6**), o que pode ser explicado pelo fato de serem constituídas, em geral, por misturas de diferentes triacilgliceróis mistos, além de conterem outras substâncias, como vitaminas lipossolúveis.

Tabela 6 – Crescimento e produção de lipase por *P. janthinellum* cultivado em diferentes fontes de carbono complexas.

Fonte de Carbono (1% m/v)	Biomassa Seca (g)	Atividade Enzimática (U/mL)	Atividade Específica (U/ µg prot.)	$Y_{P/X}$ (U/g)	P_L (U/h)
Óleo de Milho	0,214 ± 0,01	0,166 ± 0,03	0,283 ± 0,05	19,284	0,057
Óleo de Canola	0,204 ± 0,04	0,276 ± 0,00	0,457 ± 0,00	30,121	0,085
Óleo de Linhaça	0,219 ± 0,05	0,865 ± 0,10	1,035 ± 0,03	86,859	0,264
Óleo de Soja	0,194 ± 0,00	0,304 ± 0,07	0,594 ± 0,06	32,564	0,087
Óleo de Girassol	0,199 ± 0,01	0,310 ± 0,05	0,540 ± 0,02	33,547	0,092
Óleo de Rícino	0,226 ± 0,03	0,229 ± 0,02	0,354 ± 0,03	20,537	0,064
Azeite de Dendê	0,217 ± 0,00	0,231 ± 0,07	0,452 ± 0,07	22,859	0,068
Azeite de Oliva	0,201 ± 0,03	1,139 ± 0,10	1,624 ± 0,08	115,959	0,324
Gordura de Frango	0,216 ± 0,00	0,139 ± 0,06	0,225 ± 0,03	13,811	0,041
Banha Suína*	0,217 ± 0,00	0,033 ± 0,02	0,082 ± 0,01	3,596	0,010
Sebo Bovino*	0,039 ± 0,00	0,044 ± 0,02	0,013 ± 0,02	26,872	0,014

$Y_{P/X}$ – Rendimento em biomassa seca. P_L – Produtividade lipase. Cultivo realizado em pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante 3 dias. *Adição de 0,1% (m/v) de Tween 80.

O valor mais elevado de produção de lipase foi observado com azeite de oliva (1,139 ± 0,10 U/mL), seguido de óleo de linhaça (0,865 ± 0,10 U/mL), os quais apresentam maiores porcentagens de triacilgliceróis com insaturações em posições e quantidade adequadas, sendo o ácido oleico (C18:1 Δ^9) o componente majoritário destes óleos (SCHILLER et al., 2002). Banha suína e sebo bovino apresentaram os menores valores de atividade, provavelmente devido ao alto grau de saturação de seus ácidos graxos, o que dificulta a emulsificação e confere a característica de serem sólidos à temperatura ambiente. Sebo bovino também apresenta maiores quantidade de isômeros trans, que colabora para maior compactação das caudas dos ácidos graxos presentes nesses triacilgliceróis, dificultando a ação da enzima

(BELLORINI et al., 2005). Desta maneira, azeite de oliva foi a fonte de carbono selecionada para produção de lipase por *P. janthinellum*.

4.2.3. Influência da concentração da fonte de carbono

Não somente a natureza da fonte de carbono influencia a produção de lipase, mas também sua concentração. Para avaliar tal influência, *P. janthinellum* foi submetido a cultivos com diferentes concentrações de azeite de oliva.

Dentre as concentrações avaliadas, é possível verificar que concentrações iguais ou superiores a 0,5% levaram a respostas semelhantes quanto à atividade enzimática, considerando o erro experimental (**Figura 6**). Porém, a atividade específica, o rendimento por massa de substrato inicial e o rendimento por biomassa seca foram consideravelmente mais elevados para a concentração de 0,5% (**Figura 6 e Tabela 7**). Lima et al. (2003) também reduziram para 0,5% a concentração de azeite de oliva do cultivo após otimização, porém observaram efeito negativo sobre a produção desta enzima para quantidades superiores a 1,0%, o que não aconteceu neste caso.

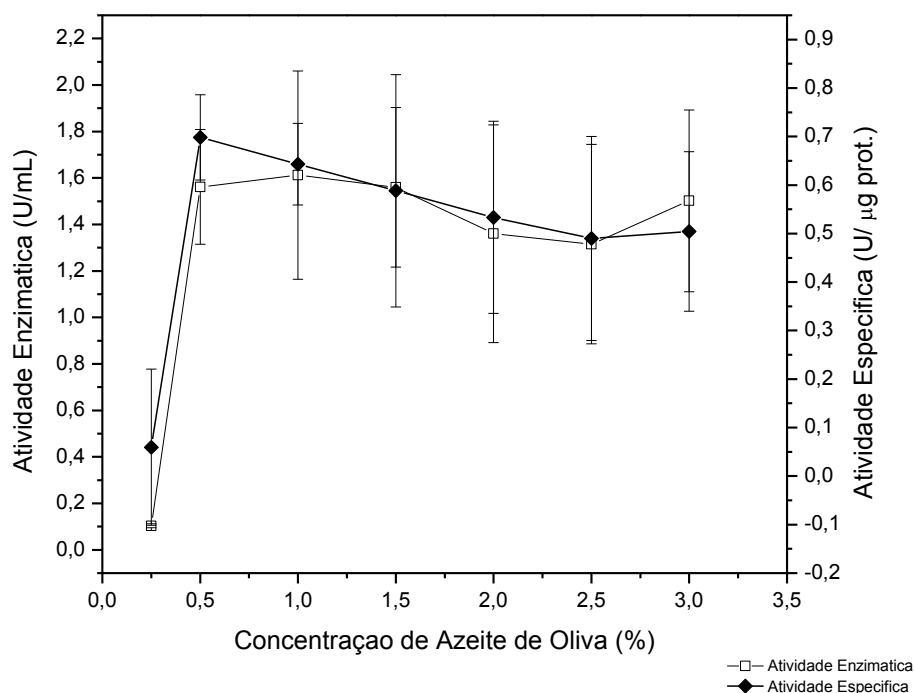


Figura 6. Influência da concentração de azeite de oliva sobre a atividade enzimática e atividade específica. Condições de cultivo: pH 5,5, 28°C e agitação de 160 rpm, durante três dias. (□) Atividade Enzimática (U/mL). (♦) Atividade Específica (U/ μg prot.).

Tabela 7 – Crescimento e produtividade de lipase de *P. janthinellum* cultivado em diferentes concentrações de azeite de oliva.

Concentração (% m/v)	Biomassa Seca (g)	Y_{P/S_0} (U/g)	$Y_{P/X}$ (U/g)
0,25	0,069 ± 0,00	20,656	1,493
0,50	0,129 ± 0,00	249,876	12,108
1,00	0,149 ± 0,02	125,725	10,818
1,50	0,217 ± 0,06	79,022	7,184
2,00	0,262 ± 0,04	53,058	5,191
2,50	0,298 ± 0,02	41,569	4,412
3,00	0,289 ± 0,04	39,040	5,194

Y_{P/S_0} – Rendimento por grama de substrato inicial. $Y_{P/X}$ – Rendimento por biomassa seca. Cultivo realizado em pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm durante 3 dias.

O fato de *P. janthinellum* apresentar boa produção de lipase com baixas concentrações de azeite de oliva é vantajoso do ponto de vista industrial, pois em países como Brasil, este não é considerado um substrato de baixo custo.

A concentração de substrato de 0,5% foi selecionada para dar continuidade ao processo de otimização da produção de lipase, devido ao seu elevado rendimento por massa de substrato inicial e também devido à elevada atividade específica, uma vez que a atividade por unidade de volume aparentemente não apresentou diferença.

4.2.4. Influência da temperatura de cultivo

A avaliação do efeito da temperatura de cultivo é de grande importância, já que este fator está intimamente relacionado ao crescimento microbiano e, assim, à produção enzimática. Excetuando-se os extremófilos, os micro-organismos, em geral, não são capazes de crescer a temperaturas muito baixas ou muito altas, devido, principalmente, à rigidez da membrana plasmática no primeiro caso e à desnaturação proteica no segundo, sendo que as temperaturas mínimas e máximas de crescimento variam amplamente entre os micro-organismos. O aumento da temperatura atua de maneira a acelerar os processos metabólicos, fazendo com que reações químicas e enzimáticas ocorram com maiores velocidades, resultando em aumento de crescimento. Contudo, a elevação da temperatura tem efeito positivo até certo limite, a partir do qual as proteínas são desnaturadas e os danos às células podem ser irreversíveis (MADIGAN et al., 2010).

A **Figura 7** mostra o crescimento e atividade lipase por unidade de volume de *P. janthinellum* nas diferentes temperaturas de cultivo. É possível observar que o crescimento e a produção de lipase apresentaram perfis ligeiramente distintos. O crescimento fúngico não apresentou grandes alterações de 24 a 28 °C, apresentando pico a 30°C ($0,152 \pm 0,00$ g) seguido de queda acentuada a 32°C. Já atividade lipase apresentou aumento considerável de 24 a 28°C, sendo máxima a 28°C ($1,535 \pm 0,05$ U/mL), com leve queda a 30°C e diminuição acentuada a 32°C.

No intervalo de temperatura analisado foi possível observar que o micro-organismo em questão é um mesófilo típico. É possível verificar também que variações pequenas acarretam diminuições consideráveis na produção de lipase, fato que também foi observado por Lima et al. (2003) para *Penicillium aurantiogriseum*.

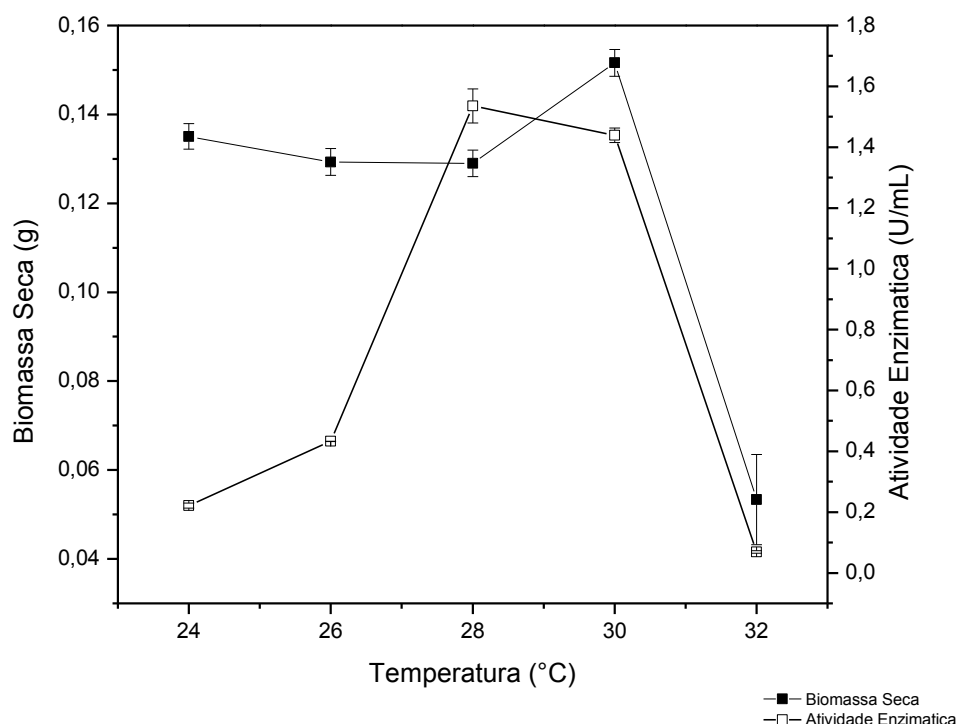


Figura 7 – Crescimento e atividade enzimática lipase em diferentes temperaturas de cultivo. Condições de cultivo: pH 5,5, sob agitação de 160 rpm por 3 dias. (■) Biomassa Seca (g); (□) Atividade Enzimática (U/mL).

Estes resultados são semelhantes a outros apresentados na literatura para fungos do gênero *Penicillium*. Dheeman et al. (2011) e Freire et al. (1997) verificaram maior produção de lipases também a 28°C para *Penicillium* sp. DS-39 e *P. restrictum*, respectivamente, e Lima et al. (2003) obtiveram maior produção desta enzima a 29°C para *P. aurantiogriseum*. Porém, Maliszweska e Mastalerz (1992) observaram maior produção de lipase a uma temperatura mais baixa em *Penicillium citrinum*, 22°C.

Para os experimentos seguintes, a temperatura de 28°C foi selecionada, pois nessa condição se observou maior produção enzimática.

4.2.5. Influência das fontes de nitrogênio, pH e agitação

Para a avaliação da influência das três fontes de nitrogênio presentes no meio de cultivo, do pH e da agitação sobre a produção de lipase optou-se por um modelo matemático de planejamento fatorial fracionado com cinco variáveis (2^{5-1}), bactopectona, extrato de levedura, nitrato de sódio, pH e agitação. Os valores

estabelecidos para os dois níveis trabalhados (+1 e -1) encontram-se na **Tabela 8**. Três ensaios no ponto central, sob as mesmas condições reportadas nos estudos anteriores (**Tabela 9**), foram acrescentados à matriz para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados.

Tabela 8 – Níveis das variáveis estudadas no delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Variável	-1	0	+1
Bactopeptona (g/L)	4	5	6
Extrato de levedura (g/L)	0	1	2
Nitrato de sódio (g/L)	0	0,5	1
pH	4	5,5	7
Agitação (rpm)	100	160	220

A atividade total de lipase encontra-se na Tabela 9, os resultados obtidos nos experimentos foram analisados pelo software Statistica 7.0 e em todos os ensaios os efeitos principais de acordo com um modelo linear foram calculados.

O planejamento realizado mostrou que variações nos parâmetros analisados não influenciaram significativamente a produção de lipase ($p > 0,1$) (**Tabela 10**), já que a produção obtida com os ensaios no ponto central foram superiores às produções dos demais ensaios (**Tabela 9**). Isto indica que os valores utilizados no ponto central correspondem ao ótimo em relação a estas variáveis e que a atividade enzimática é extremamente sensível a alterações nestes parâmetros.

Tabela 9 – Planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}) para avaliação de 5 fatores sobre produção de lipase por *P. janthinellum*. Variáveis reais e codificadas (-1 e +1).

Ensaio	Bactopeptona (g/L)	Extrato de Levedura (g/L)	Nitrato de Sódio (g/L)	pH	Agitação (rpm)	Atividade Total (U)
1	4 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	220	3,286
2	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	4 (-1)	100	2,340
3	4 (-1)	2 (+1)	0 (-1)	4 (-1)	100	2,394
4	6 (+1)	2 (+1)	0 (-1)	4 (-1)	220	2,688
5	4 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	4 (-1)	100	2,288
6	6 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	4 (-1)	220	3,075
7	4 (-1)	2 (+1)	1 (+1)	4 (-1)	220	3,580
8	6 (+1)	2 (+1)	1 (+1)	4 (-1)	100	3,719
9	4 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (+1)	100	1,935
10	6 (+1)	0 (-1)	0 (-1)	7 (+1)	220	7,760
11	4 (-1)	2 (+1)	0 (-1)	7 (+1)	220	2,880
12	6 (+1)	2 (+1)	0 (-1)	7 (+1)	100	3,461
13	4 (-1)	0 (-1)	1 (+1)	7 (+1)	220	3,841
14	6 (+1)	0 (-1)	1 (+1)	7 (+1)	100	0,000
15	4 (-1)	2 (+1)	1 (+1)	7 (+1)	100	7,728
16	6 (+1)	2 (+1)	1 (+1)	7 (+1)	220	3,501
17 (C)	5 (0)	1 (0)	0,5 (0)	5,5 (0)	160 (0)	30,907
18 (C)	5 (0)	1 (0)	0,5 (0)	5,5 (0)	160 (0)	32,487
19 (C)	5 (0)	1 (0)	0,5 (0)	5,5 (0)	160 (0)	30,237

(C) – Ponto central do experimento (corresponde às condições já utilizadas anteriormente).

Tabela 10 – Análise estatística do delineamento fatorial fracionado 2^{5-1} sobre atividade total de lipase (U).

Variáveis	Efeito	Desvio Padrão	t(13)	p
Bactopeptona	-0,171125	6,207191	-0,027569	0,978425
Extrato de levedura	0,680625	6,207191	0,109651	0,914361
Nitrato de sódio	0,125875	6,207191	0,020279	0,984129
pH	0,969375	6,207191	0,156170	0,878298
Agitação	0,841000	6,207191	0,135488	0,894301

Apesar da não significância estatística das variáveis estudadas, foi possível observar que todas as variáveis apresentaram influências positivas sobre o processo (**Figura 8**), exceto bactopectona. Entretanto, seu baixo efeito (-0,17) e, principalmente, a insignificância da influência ($p > 0,1$) permitem concluir que o valor utilizado até então (5 g/L) é adequado ao processo (**Tabela 10**).

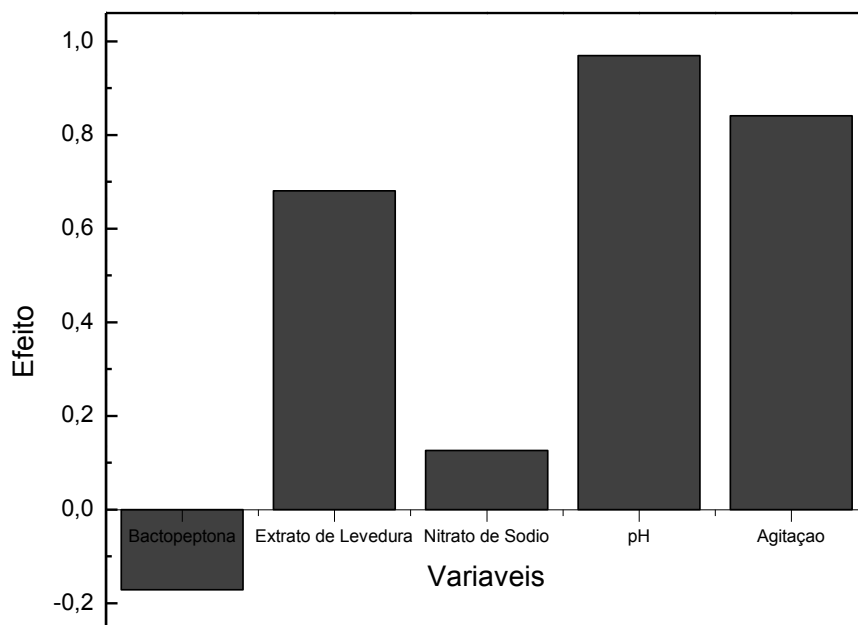


Figura 8 – Efeito das variáveis analisadas sobre a produção de lipase por *P. janthinellum*.

Para fungos do gênero *Penicillium* a melhor produção de lipase é, geralmente, obtida com uma combinação de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas, como observado para esta linhagem de *P. janthinellum* (Lima et al., 2003). Porém, as fontes orgânicas desempenham papel mais decisivo na produção de lipase. Pimentel e colaboradores (1994) obtiveram produção de lipase por *P. citrinum* em meios adicionados apenas de fontes orgânicas, mas não obtiveram produção em meios contendo apenas fontes inorgânicas.

Levando-se em consideração que as variáveis não influenciaram significativamente os resultados, todos os parâmetros analisados foram fixados no ponto central (C), continuando o estudo com as condições utilizadas anteriormente, ou seja, bactopectona na concentração de 5 g/L, extrato de levedura 1 g/L, nitrato de

sódio 0,5 g/L, pH 5,5 e agitação de 160 rpm. Desta maneira, a metodologia do planejamento fatorial fracionado pode ser considerada válida, uma vez que em apenas uma batelada de ensaio pode-se concluir que as condições utilizadas no presente estudo, para os parâmetros fonte de nitrogênio, pH e agitação se mostraram os melhores para a produção de lipase por *P. janthinellum*.

4.3 Caracterização bioquímica de lipase produzida por *P. janthinellum*

4.3.1 Determinação do pH ótimo de atividade

O conhecimento das características bioquímicas das enzimas é primordial para uma aplicação bem sucedida das mesmas. O pH do meio exerce grande influência sobre a atividade enzimática, pois interfere na carga líquida das proteínas, modificando as forças eletroestáticas que estabilizam a estrutura proteica (NELSON e COX, 2011). Assim, a atividade ótima de catálise da lipase produzida por *P. janthinellum* foi determinada com a enzima presente no filtrado de cultura obtido nas melhores condições anteriormente estabelecidas (**Figura 9**).

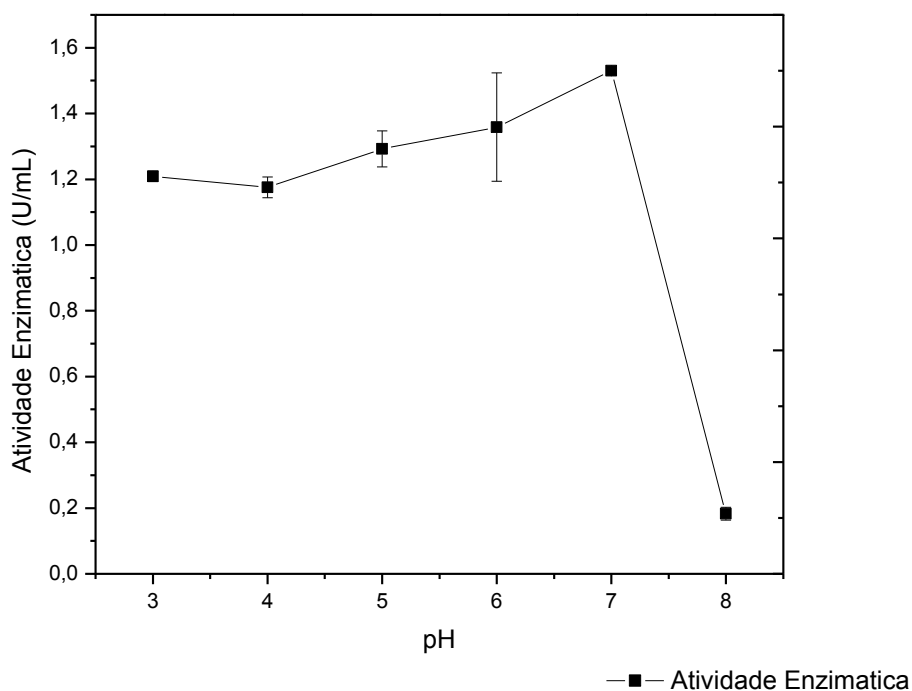


Figura 9 – Influência do pH sobre a atividade lipase de *P. janthinellum*. (■) Atividade determinada em tampão McIlvaine. Condições de cultivo: pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm por 3 dias.

Nas condições do ensaio, o pH ótimo da lipase produzida por esta linhagem de *P. janthinellum* foi 7,0, o que está de acordo com outras lipases produzidas por fungos do gênero *Penicillium*, as quais geralmente apresentam-se de neutras à ligeiramente alcalinas, sendo que a faixa de pH ótimo normalmente varia de 7,0 a 9,0 (LI e ZONG, 2010).

Em pHs mais ácidos a atividade enzimática não sofreu grandes alterações, mantendo 78,5% da atividade máxima em pH 3,0. Porém, em pH 8,0 uma queda acentuada de atividade foi observada, a qual pode estar também relacionada à interferência do pH alcalino sobre algum componente do meio reacional da metodologia utilizada para o ensaio enzimático. Dessa maneira, outras análises são necessárias para confirmação deste resultado da atividade lipase em pHs alcalinos.

Ainda, foi possível observar que a lipase em questão apresentou atividade elevada na faixa de pH de 3,0 a 7,0, fato que a difere de outras lipases de *Penicillium* descritas na literatura, as quais apresentam atividades elevadas em faixas mais estreitas de pH. A lipase de *P. citrinum* descrita por Maliszewska e Mastalerz (1992), apresentou atividade relativa acima de 70% entre pH 5,0 e 7,0, e a lipase de *Penicillium* sp. DS-39, estudada por Dheeman et al. (2011), se manteve com atividade acima de 70% apenas entre pH 5,0 e 6,5.

4.3.2 Determinação da temperatura ótima de atividade

A função e a atividade de uma enzima estão relacionadas com sua estrutura tridimensional, a qual é mantida por interações não covalentes entre seus átomos. A temperatura atua de maneira decisiva sobre essas interações, sendo que um aumento neste fator age sobre essas ligações desestruturando a forma tridimensional nativa, causando desnaturação, com consequente perda da atividade enzimática (NELSON e COX, 2011). Dessa maneira, a determinação da temperatura ótima é importante para que a lipase seja utilizada de maneira adequada.

A **Figura 10** apresenta a atividade lipase em diferentes temperaturas de incubação, sendo que a atividade ótima de catálise foi atingida a 45°C ($1,43 \pm 0,08$ U/mL). A 40°C a atividade também foi elevada ($1,09 \pm 0,04$ U/mL), correspondendo a 76,8% da atividade máxima, decrescendo até 56,6% a 30°C. Em temperaturas mais elevadas, quedas mais acentuadas na atividade enzimática foram observadas, com apenas 20,2% da atividade máxima a 55°C.

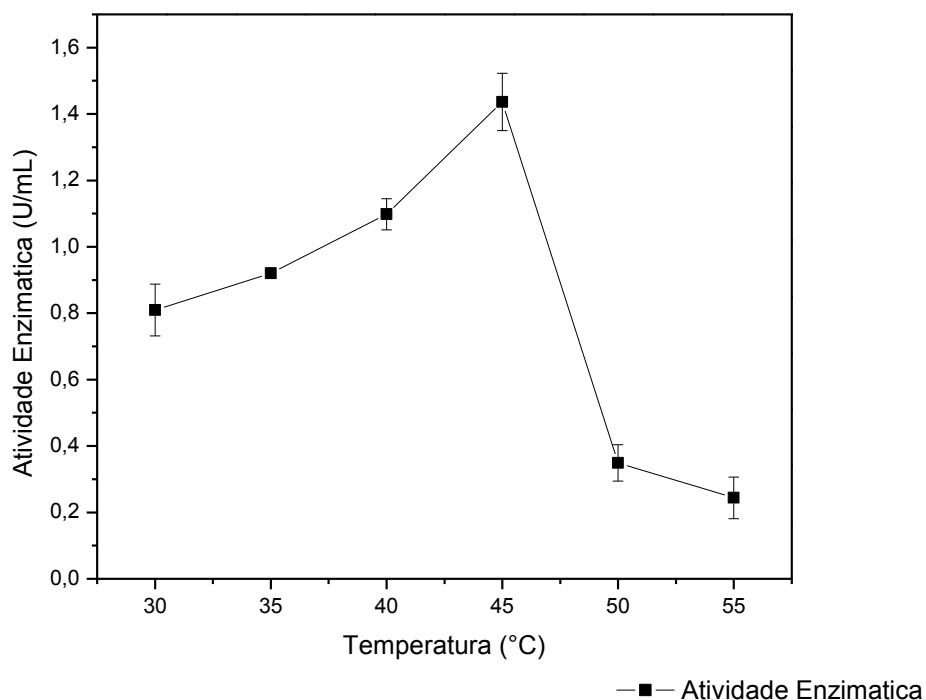


Figura 10 – Influência da temperatura sobre a atividade lipase de *P. janthinellum*. Condições de cultivo: pH 5,5, a 28°C, sob agitação de 160 rpm por 3 dias.

A temperatura ótima de catálise para lipases varia consideravelmente entre as diferentes espécies de *Penicillium*, sendo citadas na literatura temperaturas de 25 a 60°C, porém a faixa entre 30 e 45°C é a mais comumente verificada (LI e ZONG, 2010). Em acordo com estes autores, a temperatura de 45°C observada para esta linhagem de *P. janthinellum* também foi verificada como ótima para *P. expansum*, *P. citrinum* e *P. chrysogenum*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de lipase por fungos do gênero *Penicillium* é frequentemente abordada na literatura, porém o estudo da produção desta enzima por *Penicillium janthinellum* é inédito, uma vez que corresponde ao primeiro relato de produção de lipase por esta espécie fúngica.

A linhagem de *Penicillium janthinellum* estudada no presente trabalho apresentou produção de lipase apenas no meio de cultura de Dheeman et al. (2011), meio 2 ($0,476 \pm 0,04$ U/mL), composto por bactopectona, extrato de levedura, nitrato de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio hepta-hidratado, fosfato monobásico de potássio e azeite de oliva. Neste meio, a maior produção desta enzima foi observada em 72 horas de cultivo.

A avaliação da influência de fontes de carbono puras sobre a produção de lipase indicou que esta produção é indutível, pois a atividade enzimática por unidade de volume observada para o melhor indutor, ácido esteárico (C18:0), foi 32,5 vezes superior àquela verificada em meio contendo glicose, podendo ainda estar sujeita à repressão catabólica. Dentre os triacilgliceróis avaliados, trioleína induziu a maior produção enzimática ($0,074 \pm 0,03$ U/mL), a qual é composta por três ácidos oleicos, ácidos graxos de cadeia longa monoinsaturados Δ^9 .

Dentre as fontes de carbono complexas avaliadas, a melhor produção de lipase foi verificada com adição de azeite de oliva ao meio de cultivo ($1,139 \pm 0,10$ U/mL), seguida de óleo de linhaça ($0,865 \pm 0,10$ U/mL), os quais são compostos majoritariamente por triacilgliceróis constituídos por ácido oleico.

A melhor produtividade foi obtida com concentração de 0,5% (m/v) de azeite de oliva. A temperatura ótima de cultivo de *P. janthinellum*, visando a produção de lipase, foi de 28°C. O pH inicial do meio de cultivo que apresentou melhor produção enzimática foi 5,5 e a agitação foi de 160 rpm. Quanto às fontes de nitrogênio, a combinação de fontes orgânicas e inorgânicas se mostrou a melhor condição para a produção de lipase por este fungo, sendo utilizados bactopectona, extrato de levedura e nitrato de sódio (5 : 1 : 0,5).

A determinação das melhores condições para a produção de lipase por *P. janthinellum* levou a um aumento da atividade enzimática de 3,25 vezes em relação às condições iniciais.

O pH ótimo de catálise da enzima presente no filtrado de cultura foi 7,0, sendo mantida 78,5% da atividade máxima até em pH 3,0, e a temperatura ótima foi 45°C, sendo que mais de 50% da atividade foi mantida até 30°C. Estas características podem ser favoráveis a uma futura aplicação industrial desta enzima em processos que atuem em pHs ácidos, como tratamentos de efluentes de indústrias de laticínios, resolução de ésteres na indústria farmacêutica ou adicionada em processos na indústria de alimentos. Estes resultados são também essenciais para futura purificação e caracterização desta enzima.

REFERÊNCIAS

- AÇIKEL, U.; ERSAN, M.; AÇIKEL, Y. S. Optimization of critical medium components using response surface methodology for lipase production by *Rhizopus delemar*. **Foods and Bioproducts Processing**. V. 88, p. 31-39, 2010.
- ALMEIDA, A. F. **Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii***. 2012. 211f. Tese (doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2012.
- ARAVINDAM, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**. V. 6, p. 151-158, abr. 2007.
- BANCERZ, R.; GINALSKA, G.; FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotropic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 32, p. 253-260, 2005.
- BELLORINI, S.; STRATHMANN, S.; BAETEN, V.; FUMIERE, O.; BERBEN, G.; TIRENDI, S.; VON HOLST, C. Discriminating animal fats and their origins: assessing the potentials of Fourier transform infrared spectroscopy, gas chromatography, immunoassay and polymerase chain reaction techniques. **Anal Bioanal Chem**. V. 382, p. 1073-1083. 2005.
- CARVALHO, P. A.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. D.; OLIVEIRA, J. G.; SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 75-80. 2003.
- COLIN, V. L.; BAIGORI, M. D.; PERA, L. M. Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **Journal of Basic Microbiology**. V. 50, p. 52-58, 2010.
- DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 26, p. 657-663, 2000.
- DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 72, 256– 262, 2011.
- FREIRE, D. M.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA J. R., G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. Effect of carbon and nitrogen sources, agitation and aeration. **Applied and Biochemistry Biotechnology**, v. 63–65, p. 409–421, 1997.
- FOJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T. N.; PETERSEN, S. B. What distinguishes a esterase from a lipase: a novel structural approach. **Bioquímie**. V. 82, p. 1033-1041, 2000.

FONTENELLE, M. N. **Tratamento de efluentes líquidos da indústria de laticínios de Minas Gerais**. 2006. 60f. Monografia (Especialização em engenharia sanitária e meio ambiente). DESA, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

GANDHI, N. N. Applications of lipases. **JAACS**. v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GOSH, P. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**. United States of America, v. 79, n. 2, p. 119-157, 1996.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, W. S. Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potencial in ester synthesis. **Process Biochemistry**. V. 35, p. 459-464, 1999.

GUPTA, R.; RATHI, P.; GUPTA, N.; BRADDOO, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnology Applied Biochemistry**. V. 37, p. 63-71, 2003.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; JAVED, S.; HAMEED, A. Enzymes used in detergents: lipases. **African Journal of Biotechnology**. V. 9, n. 31, p. 4836-4844, ago. 2010.

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Applied Microbiology: Industrial**. p. 385-392, 2009.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 118, p. 155-170, 2004.

IBRAHIM, C.O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. **Bioresource Techonology**. V. 99, p. 4572-4582. 2008.

KUMAR, S.; KILKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Prot. Exp. Purif.** V. 41, p. 38-44, 2005.

LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**. V. 66, p. 43-54, 2010.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M.I.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; FONTANA, J.D. Effect of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, p. 105-110. 2003.

LIN, E.; WANG, C.; SUNG, S. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 39, p. 98-102, 2006.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de BROCK**, 12. ed., 2010.

MALISZEWSKA, I.; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipase from *Penicillium citrinum*. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**. V. 14, p. 190-193, mar. 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger** : Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2011.

NOINVILLE, S.; REVAULT, M.; BARON, M.; TISS, A.; YAPOUDJIAN, S.; IBANOVA, M.; VERGER, R. Conformational Changes and Orientation of *Humicola lanuginosa* Lipase on a Solid Hydrophobic Surface: An in Situ Interface Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflection Study. **Biophysical Journal**. V. 82, p. 2709-2719, mai. 2002.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**. São Paulo, v. 29, n. 01, p. 93-99, jan./fev. 2006.

PIMENTEL, M. C. B.; MELO, E. H. M.; FILHO, J. L. L.; LEDINGHAM, W. M.; DURÁN, N. Lipase from a brazilian strain *Penicillium citrinum* cultured in a simple and inexpensive medium: heat denaturation, kinetics and pH stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 66, p. 185-195. 1997.

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species**. 3. ed. North Ryde: Food Science Australia, 1985, 62p.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY; KLEIN. **Microbiology**. 5. ed. 2002.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 145-150, jan. 2002.

RUEGGER, M. J. S. Atividade enzimática e produção de ácido linoléico por fungos filamentosos isolados do solo da Região do Banhado Grande, na Estação Ecológica Juréia-Itatins, SP. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2001.

RUIZ, B.; FARRÉS, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SÁNCHEZ, S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**. V. 36, n. 3, p. 283-289, 2001.

SARKAR, S.; SREEKANTH, B.; KANT, S.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Production and optimization of microbial lipase. **Bioprocess Engineering**. V. 19, p. 29-32, 1998.

SCHILLER, J.; SUB, R.; PETKOVIC, M.; ARNOLD, K. Thermal stress of unsaturated vegetable oils: effects analysed by MALDI-TOF mass spectrometry, ¹H e ³¹P NMR spectroscopy. **Eur Food Res Technol**. V. 215, p. 282-286. 2002.

SEDMAN, J.J.; GROSSBERG, S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250. **Analyt Biochem**, v.78, p.544-552, 1977.

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

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry Biotechnology**. V. 166, n. 2, p. 486-520, 2012.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. A review on microbial lipases production. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 182-196. 2010.

VOCUS; PRWEB. **Global Industrial Enzymes Market to reach US\$3.74 billion by 2015**, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc. 2011. Disponível em:

<http://www.prweb.com/releases/industrial_enzymes/proteases_carbohydrases/prweb8121185.htm>. Acesso em: 14 set. 2012.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbiology and Genetic Bulletin**, 13, 42-43. 1956.

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. Disponível em: <<http://www.worthington-biochem.com/default.html>>. Acesso em: 04 out. 2012.

YANG, J.; KOGA, Y.; NAKANO, H.; YAMANE, T. Modifying the chain-length selectivity of the lipase from *Burkholderia cepacia* KWI-56 through in vitro combinatorial mutagenesis in the substrate-binding site. **Protein Engineering**. V. 15, p.147-152, 2002.

Rio Claro, 12 de novembro de 2012.

Daniela Flavia Machado Turati

Co-orientador: Dr. Alex Fernando de Almeida

Orientadora: Prof. Dra. Eleonora Cano Carmona