

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Cultivo submerso de *Aspergillus*
empregando óleos vegetais visando a síntese
de lipases para aplicação industrial**

Mariana Vendrasco Tacin

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ariela Veloso de Paula
Coorientador no exterior: Prof^o. Dr^o. Jose M. Palomo

Araraquara
2018

Cultivo submerso de *Aspergillus* empregando óleos vegetais visando a síntese de lipases para aplicação industrial

Mariana Vendrasco Tacin

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Doutora em Alimentos e Nutrição.

Área de concentração: Ciências de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ariela Veloso de Paula
Coorientador no exterior: Prof^o. Dr^o. Jose M. Palomo

Araraquara
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

T118c Tacin, Mariana Vendrasco.
Cultivo submerso de *Aspergillus* empregando óleos vegetais visando a síntese de lipases para aplicação industrial / Mariana Vendrasco Tacin. – Araraquara, 2018.
160 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de concentração em Ciências de Alimentos.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.
Coorientadora: Ariela Veloso de Paula.
Coorientador: Jose M Palomo.

1. Lipases. 2. *Aspergillus*. 3. Cultivo submerso. 4. Biocatálise. 5. Aromas.
Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, orient. II. Paula, Ariela Veloso de, coorient.
III. Palomo, Jose M., coorient. IV. Título.

CAPES: 50700006

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao CNPq pelos auxílios financeiros.

À professora Valéria Ebinuma pela orientação, paciência e apoio nesses 4 anos de convívio. Agradeço, imensamente, por tudo o que aprendi em todo esse tempo.

Ao professor Jose M. Palomo por me receber em seu laboratório e me orientar nos 6 meses de estágio Sanduíche.

Ao professor Jorge Brandão pelos momentos de troca nas reuniões de grupo.

Aos técnicos Flávio, Ana Lúcia, Adriana e Matheus, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, por todo auxílio prestado.

À professora Ariela Veloso pelo auxílio na coorientação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara.

À Seção técnica de pós-graduação por todo auxílio e prestatividade em todos esses anos.

Agradecimentos pessoais

À minha família por compartilhar comigo os momentos de alegria e pelo apoio nos momentos de apreensão e incertezas.

Aos colegas do BioPPul pela convivência e auxílio no laboratório, e compartilhamento de conhecimentos nas reuniões de grupo.

Aos colegas do laboratório de Química Biológica y Biocatálisis, do Instituto de Catálisis y Petroleoquímica: Adriana, Rocío, David e professores Jose M. Palomo e Cesar Mateo, pela ajuda e companhia nos meses de estágio no laboratório.

Aos amigos que fiz no período do estágio Sanduíche: Ana Clarissa, Fabrício, Jaque, Tamires, Thays, Rafael, Thaísa, Josenildo, Deborah, Chico, Rogéria e Monica. Meus meses em Madrid não teriam sido iguais sem vocês.

Aos amigos de toda a vida, que sempre estiveram presentes.

“Aprender é, de longe, a maior recompensa.”

William Hazlitt

Resumo

As lipases são enzimas amplamente aplicadas em processos industriais. Sua obtenção por fungos filamentosos apresenta algumas vantagens em relação às outras fontes e por isso estudos de incremento de sua produção vêm sendo realizados. Aliado ao processo de obtenção, técnicas de imobilização de enzimas podem melhorar sua estabilidade em relação à temperatura e pH, e diminuir custos associados à sua aplicação devido à possibilidade de reaproveitamento da enzima imobilizada nos processos biocatalíticos. **Objetivo:** este trabalho teve como objetivo estudar a produção de lipases pela cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727, a imobilização da referida enzima em suporte octil-sepharose, sua caracterização na forma livre e imobilizada e a aplicação da enzima imobilizada na obtenção de ésteres. **Métodos:** a produção da enzima foi realizada por 96 horas em cultivo submerso, avaliando-se diferentes fontes de carbono (óleos de soja, oliva, semente de uva e de algodão) como substratos indutores da produção enzimática. Posteriormente, estudou-se a imobilização da enzima em suporte octil-sepharose® por adsorção através de interação hidrofóbica, após o meio fermentado ter sido submetido à 4 ciclos de extração do óleo residual da fermentação com n-hexano. O processo de imobilização da enzima foi realizado em cascata em 4 ciclos com a finalidade de sobrecarga da enzima no suporte. Os testes de estabilidade foram feitos por 24 horas, nas temperaturas de 30 à 70°C e pH de 3 a 9 com a enzima livre e imobilizada. Como última etapa do trabalho, aplicou-se a enzima imobilizada na obtenção do éster propionato de isoamila. **Resultados:** Na etapa de produção, as melhores condições para a obtenção da enzima foram: óleo de semente de uva como indutor e 96 horas de cultivo. A lipase produzida apresentou maior atividade quando na presença do substrato *p-nitrofenil propionato* e, com a imobilização por 4 ciclos em suporte octil-sepharose, pode-se obter um derivado com a lipase adsorvida de peso molecular de, aproximadamente, 45 kDa. Em relação à caracterização da lipase produzida, obteve-se pH ótimo de 7,5 e 5 e, temperatura ótima de 45 e 50°C, na sua forma livre e imobilizada, respectivamente. A enzima imobilizada apresentou uma faixa de estabilidade superior à da enzima livre em relação ao pH, sendo os valores de pH de 4, 5 e 6 para a enzima imobilizada e de 7 e 7,5 para enzima livre, ao longo de 24 horas de incubação. No ensaio de estabilidade em relação à temperatura, a enzima imobilizada foi mais estável na faixa de 40 à 60°C e a enzima livre apresentou estabilidade de 40 à 45°C. No teste de reuso do derivado imobilizado, após 5 ciclos, a enzima imobilizada apresentou 75% da atividade inicial a qual se manteve durante outros 15 ciclos adicionais. A possibilidade de utilização da lipase imobilizada na síntese de ésteres de bioaroma deve ser estudada em relação à especificidade dos substratos empregados, sendo a escolha destes, o álcool e o ácido, essenciais para obtenção de uma taxa de esterificação satisfatória. **Conclusão:** Substratos alternativos como o óleo de semente de uva podem ser empregados como indutor visando a síntese de lipases. O processo de imobilização por adsorção em suporte octil-sepharose mostrou-se eficaz não somente para imobilizar a enzima, mas também para promover a purificação, sendo que, com este método, a enzima pode ser reutilizada satisfatoriamente. É necessário conhecer a especificidade da enzima para sua utilização e obtenção do bioproduto de interesse.

Palavras-chave: lipases; *Aspergillus*; cultivo submerso; biocatálise; aromas.

Abstract

Lipases are enzymes widely applied in industrial processes. They can be obtained by filamentous fungi which presents some advantages in relation to other sources and for this reason, studies aiming to increase its production have been performed. Moreover, the process of enzyme immobilization can improve the enzyme stability in relation to temperature and pH, and reduce the costs associated with its application due to the possibility of immobilized enzyme reuse in biocatalytic processes. The objective of this work was to study the production of lipases by *Aspergillus* sp. DPUA 1727, the immobilization of lipases produced in octyl-sepharose support and make the enzyme characterization in its free and immobilized form. Furthermore, the immobilized enzyme was applied to obtain the ester isoamyl propionate. Methods: the enzyme production was carried out for 96 hours in submerged culture, with different carbon sources (soybean, olive, grape seed, and cotton oils) as substrates. Subsequently, the enzyme immobilization in octyl-sepharose® support by adsorption through hydrophobic interaction was studied (to this experiment the fermented medium was submitted to 4 cycles to extract the residual oil with n-hexane). The enzyme immobilization process was carried out in cascade employing 4 cycles with the purpose of overloading the enzyme in the support. Stability studies were done for 24 hours, at temperatures from 30 to 70°C and pH from 3 to 9 with the enzyme-free and immobilized. As the last step of this work, the immobilized enzyme was applied in the preparation of the ester isoamyl propionate. Results: In the production stage, the best condition to obtain the enzyme were: grape seed oil as an inductor and 96 hours of cultivation. The lipase produced showed higher activity when p-nitrophenyl propionate was used as the substrate. The immobilization process employing 4 cycles in octyl-sepharose support produced a derivative with the adsorbed lipase with a molecular weight of 45 kDa. In relation to the characterization of the lipase produced, an optimum pH of 7.5 and 5 and an optimum temperature of 45 and 50°C was obtained in its free form and immobilized, respectively. The immobilized enzyme presented a stability range higher than the free enzyme in relation to pH, being pH values of 4, 5 and 6 for immobilized enzyme and 7 and 7.5 for free enzyme, over 24 hours of incubation. In the temperature stability studies, the immobilized enzyme was more stable in the temperature range of 40 to 60 °C and the free enzyme showed stability at 40 to 45 °C. In the reuse test of the immobilized derivative, after 5 cycles, the immobilized enzyme maintained 75% of its activity, which was maintained for another 15 additional cycles. The possibility of using lipase immobilized in the synthesis of bioaroma esters should be studied in relation to the specificity of the substrates used, the choice of which, the alcohol and the acid, are essential to obtain a satisfactory rate of esterification. Conclusions: Alternative substrates such as grape seed oil can be used as an inducer for the synthesis of lipases. The adsorption immobilization process on octyl-sepharose support has proved to be effective not only to immobilize the enzyme but also to promote purification, and with this method, the enzyme can be satisfactorily reused. It is necessary to know the specificity of the enzyme before its application and to obtain the bioproduct of interest.

Keywords: lipases; *Aspergillus*; submerged culture; biocatalysis; aromas.

Lista de Tabelas e Quadros

	Página
Introdução	
Quadro 1. Fontes de obtenção e os lipídios utilizados como indutores na produção de lipases fúngicas	24
Quadro 2. Exemplos de aromas que podem ser obtidos por diferentes ésteres.	33
Capítulo 1.	
Tabela 1. Atividade hidrolítica da lipase, pH e biomassa obtidos por cultivo submerso de <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727 utilizando os seguintes óleos: semente de algodão (OSA), semente de uva (OSU), oliva (OO) e soja (OS).	52
Tabela 2. Composição percentual em ácidos graxos de cadeia longa, e insaturados, dos óleos de semente de algodão, semente de uva, oliva e soja, usados na biossíntese de lipase.	53
Tabela 3. Resultados da atividade enzimática (U.mL ⁻¹), proteínas totais (U.mg ⁻¹) e o fator de purificação de cada método de purificação de lipase testado.	67
Capítulo 2.	
Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2 ³ para a síntese de propionato de isoamila.	93
Tabela 2. Resultados do planejamento fatorial 2 ³ , avaliando as variáveis "temperatura (°C)", "relação ácido: álcool" e "enzima imobilizada (mg)", em 3 níveis. Valores obtidos na síntese de propionato de isoamila (g.L ⁻¹), com desvio padrão. Letras iguais representam igualdade da média das variáveis em teste com 5% de significância.	116

Lista de Figuras

	Página
Introdução	
Figura 1. Esquema do metabolismo do triacilglicerol pela enzima lipase A) lipase regioseletiva e B) lipase não-regioseletiva.	19
Figura 2. Imagem ilustrativa das conformações abertas e fechadas do sítio ativo da lipase, provocada pela mudança de posição da “tampa”.	20
Figura 3. Imagem ilustrativa das estruturas principais do fungo do gênero <i>Aspergillus</i> .	22
Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da placa de crescimento do <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727, após tratamento com glutaraldeído 5% (v/v) e etanol 70 e 80% (v/v), mostrando as estruturas principais do fungo: hifas, esporos dispersos, conidióforos, medula e conídios. Imagem feita no Instituto de Química da UNESP Araraquara.	22
Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas, divididos entre métodos físicos e químicos.	28
Figura 6. Representação da imobilização da lipase por adsorção interfacial, suporte de caráter hidrofóbico, com a conformação da tampa aberta.	30
Capítulo 1.	
Figura 1. Árvore filogenética baseada em calmodulina para <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727 mostrando fungos familiares (modelo de dois parâmetros Kimura; algoritmo de máxima verossimilhança). Valores de bootstrap (1.000 repetições) maiores que 70% são listados.	50
Figura 2. Imagens de <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727 A) crescimento por 7 dias em placa BDA, B) conidióforo e conídios via microscopia óptica e C e D) hifas e conidióforos, desidratados após tratamento com etanol a 70 e 80%, conídios, esporos e filíades vistos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	51
Figura 3. Correlação entre a composição de ácidos graxos (%) dos diferentes óleos utilizados e a atividade enzimática (U.mL ⁻¹) da lipase produzida.	55

Figura 4. Resultados da atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (linha cheia) e atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) (linha tracejada) ao longo do cultivo submerso durante 120 horas da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 **(A)**; Curva de crescimento da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 em cultivo submerso durante 120 horas ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (linha tracejada) e pH do filtrado enzimático (linha cheia) **(B)**. As barras de erro representam intervalo de confiança de 95% para as medidas. 58

Figura 5. Caracterização da lipase produzida por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 à 37°C em relação ao pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% para as medidas, embora não possam ser observadas no gráfico B, devido aos desvios pequenos entre as médias. Na estabilidade ao pH, 100% se refere à atividade relativa no tempo zero de cada pH. 61

Figura 6. Caracterização da enzima lipase produzida por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 no pH 7,5: temperatura ótima (A) e estabilidade a temperatura (B) após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação. As barras de erro representam um intervalo de confiança de 95% para as medidas, embora não possam ser observadas no gráfico B, devido aos desvios pequenos entre as médias. Nos resultados de estabilidade de temperatura, 100% refere-se à atividade enzimática no tempo zero para cada temperatura. 63

Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da lipase precipitada em etanol: M) marcador de peso molecular (10 kDa), A) meio fermentado; B) 90 mL de meio fermentado precipitado e ressuspendido em 5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 7,5; e C) 90 mL de meio fermentado precipitado e ressuspendido em 2,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 7,5. 70

Capítulo 2.

Figura 1. Esquema de variação de inóculo de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 e adição de óleo de semente de uva nos meios fermentados. 87

Figura 2. Esquema representativo do processo de extração, com n-hexano, do óleo não utilizado na síntese de lipase na fermentação. 88

Figura 3. Esquema dos testes de imobilização da lipase utilizando suportes de diferentes hidrofobicidades: 1) 89

Imobilização em suporte octadecil seguido de suporte octil, e 2) imobilização em suporte octil seguido de suporte octadecil.

Figura 4. Esquema representando cada etapa do processo de imobilização da solução enzimática após processo de extração com n-hexano. 90

Figura 5. Atividade relativa (%) da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727, na forma livre liofilizada ($0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ de solução tampão fosfato 25 mM pH 7,5), utilizando os substratos *p*-nitrofenil propionato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato e *p*-nitrofenil palmitato. Foi considerada 100% a atividade enzimática obtida com o *p*-nitrofenil propionato ($568,61 \text{ U.g}^{-1}$). Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média. 96

Figura 6. Atividade enzimática da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 no meio fermentado (MF), e no meio fermentado liofilizado após extração com n-hexano (EH). Enzima obtida em cultivo submerso realizado variando a concentração de óleo de semente de uva e tamanho do inóculo: 10 discos de micélio (10) e 20 discos de micélio (20). Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas em algumas barras devido aos desvios pequenos entre as médias. 98

Figura 7. Géis de eletroforese das imobilizações da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727: A) imobilizada por 30 minutos em suporte octadecil-sepabeads seguido de 2 horas em octil-sepharose, e B) imobilizada por 1 hora em octil-sepharose seguido de 1 hora e meia em octadecil-sepabeads. Os números representam: 1) padrão de peso molecular, 2) solução de enzima livre liofilizada ($0,1 \text{ g.mL}^{-1}$), 3) lipase imobilizada em octil-sepharose (C8), 4) sobrenadante da imobilização em octil-sepharose, 5) lipase imobilizada em octadecil-sepabeads (C18), e 6) sobrenadante da imobilização em octadecil-sepabeads. 101

Figura 8. Atividade enzimática (U.g^{-1}) da suspensão (linha cheia) e do sobrenadante da imobilização (linha tracejada), nos 5 ciclos de imobilização em cascata realizados no suporte octil-sepharose, por adsorção hidrofóbica. Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. 104

Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page): 1) Padrão de peso molecular (kDa); 2) meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão acetato 5 mM pH 5; 3) meio 106

fermentado liofilizado ressuscitado em tampão acetato 5 mM pH 5 após extração com n-hexano; 4) enzima imobilizada em octil-sepharose, em cascata (4 ciclos); e 5-8) sobrenadantes das imobilizações em cascata.

Figura 10. Atividade da lipase produzida por cultivo submerso de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 na sua forma livre liofilizada (linha tracejada) e imobilizada em octil-sepharose (linha cheia) em relação a: pH ótimo (A) e temperatura ótima (B). Os ensaios foram realizados em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade máxima obtida com a enzima livre (pH 5, 59,20 U.mL⁻¹; 40°C, 37,16 U.mL⁻¹) e imobilizada (pH 5, 699,45 U.g⁻¹; 50°C, 1103,83 U.g⁻¹). 108

Figura 11. Estabilidade da enzima imobilizada em octil-sepharose, ressuscitado em 0,1 g.mL⁻¹: tampão glicina-HCl 5 mM (pH 3), tampão acetato 5 mM (pH 4 e 5) e tampão fosfato 5 mM (pH 6, 7 e 8) após incubação a 25°C por até 24 horas. Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida no tempo zero das dosagens com cada pH. 111

Figura 12. Estabilidade em temperatura, na faixa de 30 a 70°C por até 24 horas. Enzima imobilizada ressuscitada na concentração de 0,1 g.mL⁻¹ em tampão acetato 5 mM (pH 5). Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida no tempo zero das dosagens em cada temperatura testada. 112

Figura 13. Teste de atividade da enzima imobilizada em octil-sepharose por 20 ciclos de dosagem de atividade enzimática. Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida na primeira dosagem utilizando a enzima imobilizada (1038,25 U.g⁻¹). 114

Figura 14. Porcentagem de esterificação de cada condição testada no planejamento fatorial, sendo que as colunas representam os valores obtidos de acordo com a quantidade de enzima adicionada (mg) e sem adição de enzima, em relação à variação de temperatura (40, 50 e 60°C) e relação entre 117

ácido:álcool (1:1, 1:2 e 1:4 v/v) nos ensaios. Ensaios realizados em triplicata e as barras de erro representam desvio padrão da média.

Lista de Anexos

	Página
Capítulo 2.	
Anexo 1. Síntese de <i>p</i> -nitrofenil propionato.	129
Anexo 2. Cromatograma dos picos dos padrões de 1) solvente, 2) propionato de isoamila, 3) álcool isoamílico e 4) ácido propiônico, na mistura de 7:1:1:1, respectivamente.	130

Sumário

	Página
Resumo	viii
Abstract	ix
Lista de Tabelas e Quadros	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Apêndices e Anexos	xvi
Introdução	18
Capítulo 1. Valorização biotecnológica de óleos de resíduos agroindustriais para produção de lipases utilizando <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727 da Amazônia.	35
Resumo	
Introdução	
Materiais e métodos	
Resultados e discussão	
Conclusão	
Referências	
Capítulo 2. Imobilização da lipase de <i>Aspergillus sp.</i> DPUA 1727 em suporte hidrofóbico visando aplicações em sínteses orgânicas.	80
Resumo	
Introdução	
Materiais e métodos	
Resultados e discussão	
Conclusão	
Referências	
Anexos	
Considerações finais	131
Referências	132

1. Introdução

1.1. Lipases

As enzimas são proteínas que atuam acelerando reações, agindo como catalizadores naturais, apresentam alta seletividade e especificidade pelo substrato (1). Em termos de mercado, de todas as enzimas industrializadas, pelo menos 75% são hidrolases e destas 90% são produzidas por microrganismos através de processos fermentativos. Em 2012, o mercado mundial de enzimas para uso industrial foi de, aproximadamente, US\$ 4,5 bilhões, aumentando para cerca de US\$ 4,8 bilhões em 2013 e estima-se uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 4,7% ao ano, aumentando de US\$ 5,0 bilhões para US\$ 6,3 bilhões de 2016 para 2021 (2).

Dentre as hidrolases, as lipases (EC 3.1.1.3), também denominadas como glicerol ésteres hidrolases (3), representam o terceiro grupo de biocatalisador com maior venda no mundo (4). Essas enzimas têm como função natural a hidrólise de triglicerídeos em meio aquoso, dando origem aos ácidos graxos livres e glicerol quando a enzima não é regiosseletiva; e a sn-2 monoacilglicerol e ácidos graxos livres quando a lipase é sn-1,3 regiosseletiva (5). A Figura 1 apresenta um esquema da quebra de triacilglicerol na presença de lipases regiosseletiva (A) e não-regiosseletiva (B).

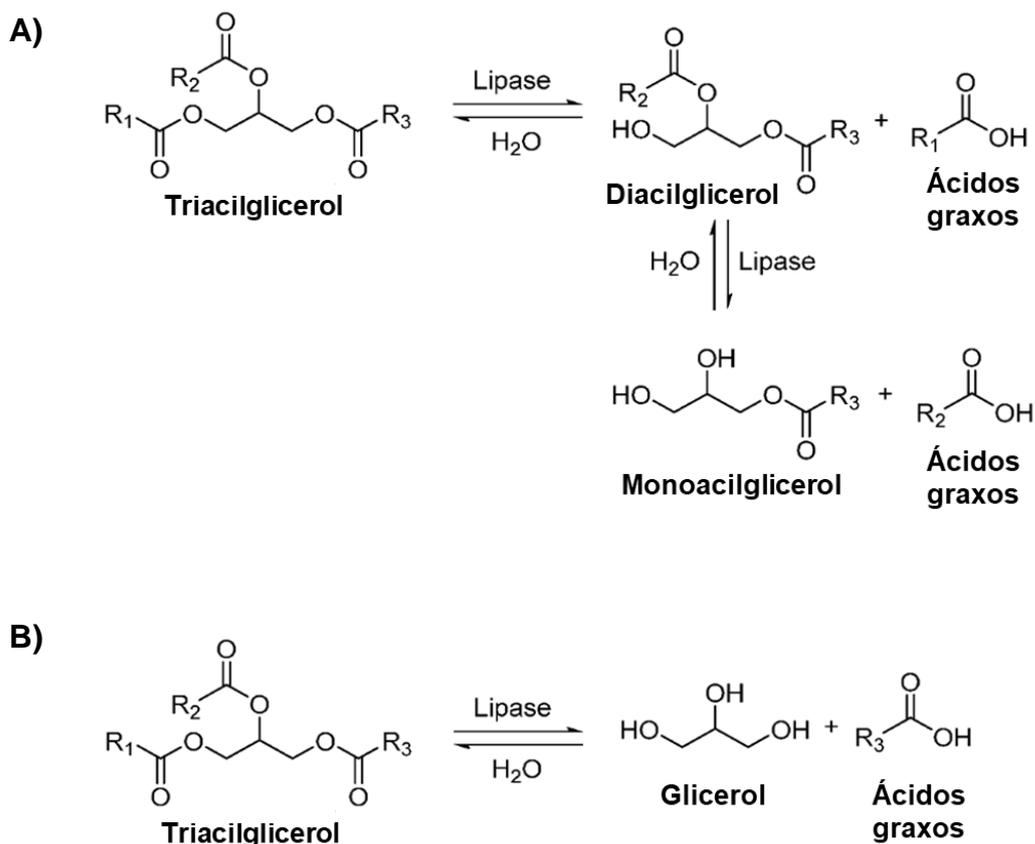


Figura 1. Esquema do metabolismo do triacilglicerol pela enzima lipase A) lipase regioseletiva e B) lipase não-regioseletiva. Fonte: Jiang e Loos (6), com modificações.

As lipases possuem a capacidade única de atuar apenas na interface óleo/água (7). Isso ocorre, pois, ao entrar em contato com o meio hidrofóbico, a “tampa” que recobre o sítio ativo da enzima (outra característica peculiar das lipases) se abre, ocorrendo o contato entre o substrato e o sítio ativo da enzima e assim acontece na reação de quebra do triacilglicerol. A “tampa” que recobre o sítio ativo de lipases é formada por uma cadeia polipeptídica que mantém o sítio ativo coberto quando está em meio hidrofílico (8,9). A imagem da figura 2 demonstra a mudança das conformações da tampa da lipase.

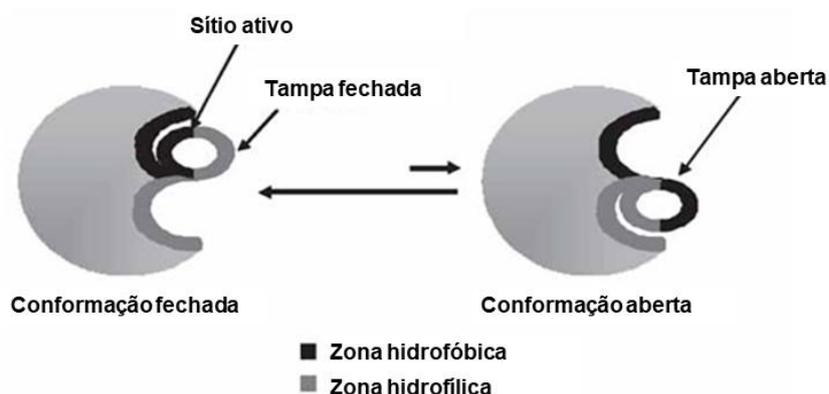


Figura 2. Imagem ilustrativa das conformações abertas e fechadas do sítio ativo da lipase, provocada pela mudança de posição da “tampa”. Fonte: adaptado de Palomo et al. (10).

Por possuírem alta regioseletividade e/ou enantioseletividade (capacidade de selecionar a posição levogira (L) ou dextrogira (D) dos enantiômeros), serem estáveis em meios com solventes orgânicos e não necessitarem de cofatores, as lipases são um importante grupo de enzimas para aplicações na química orgânica (11), na produção de detergentes, cosméticos, tratamento de água, biorremediação, indústria oleoquímica, indústria alimentícia e farmacêutica (5,7,12), entre outros.

1.2. Fontes de obtenção das lipases

As lipases podem ser obtidas por fontes animais, vegetais e microrganismos, sendo que o custo de produção deste último é mais baixo se comparado às outras fontes (13) e mais vantajosa devido à facilidade de obtenção (14). Outro benefício das lipases microbianas é sua produção, majoritariamente, extracelular, o que facilita as etapas posteriores de extração e/ou purificação (15,16).

Dentre os microrganismos produtores de lipases, os fungos são amplamente conhecidos como fonte destas enzimas, com destaque para os seguintes microrganismos: *Geotrichum*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Cepas de *Aspergillus* são importantes microrganismos utilizados na área biotecnológica devido a sua capacidade de produzir enzimas extracelulares e por serem reconhecidas como GRAS (do inglês “*Generally Recognized as Safe*”) pela agência regulatória americana “*Food and Drug Administration*” (FDA) (17) sendo assim mais indicado para aplicações em produtos de consumo humano.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são pertencentes ao filo Ascomycota (ou Ascomycetes) possuem ascos (sacos) onde os esporos são armazenados, formando a estrutura chamada ascósporo (18). Crescem formando hifas, com corpos de frutificação aéreos chamados conidióforos, contendo uma vesícula em cada extremidade, onde se formam várias estruturas, as filíades (unisseriadas ou bisseriadas) e os conídios (18). A disposição das filíades na vesícula caracteriza o gênero *Aspergillus* devido a sua forma que lembra um aspergilo, instrumento da igreja Católica utilizado para dispersar água (19), que pode ser de forma colunar ou radiado. A figura 3 apresenta uma imagem ilustrativa das estruturas principais dos fungos do gênero *Aspergillus*.

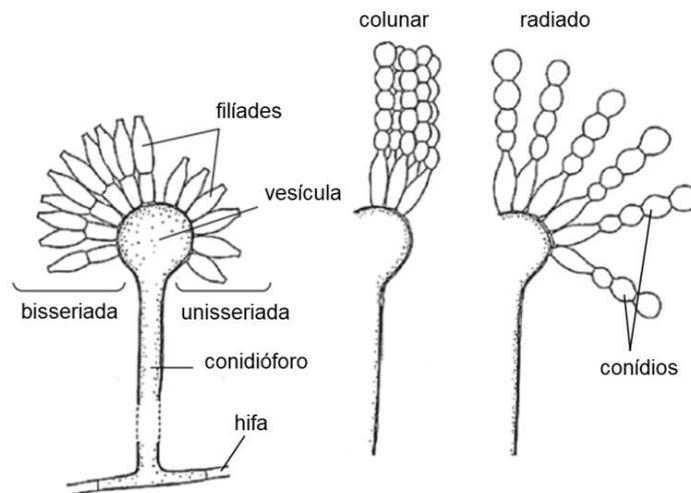


Figura 3. Imagem ilustrativa das estruturas principais do fungo do gênero *Aspergillus*. Fonte: adaptada de Guarro, Xavier e Pasqualotto (20).

A Figura 4 apresenta uma imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando as estruturas principais do fungo *Aspergillus sp.* DPUA 1727.

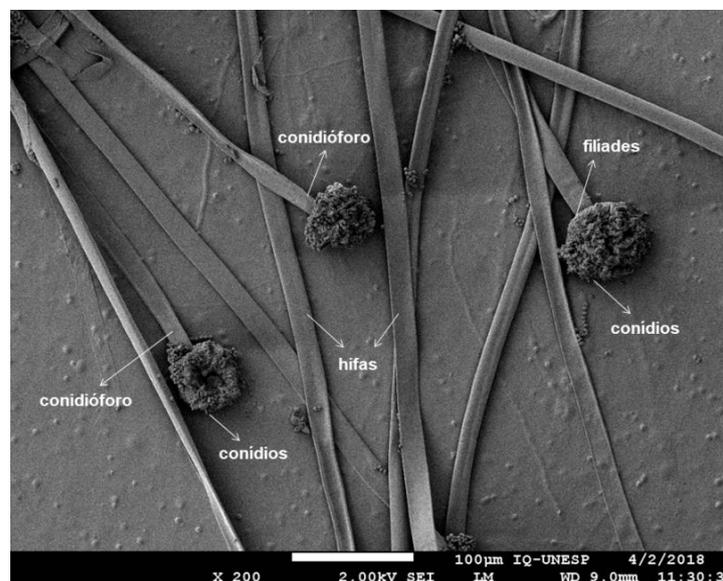


Figura 4. Imagem de microscopia eletrônica de varredura da placa de crescimento do *Aspergillus sp.* DPUA 1727, após tratamento com glutaraldeído 5% (v/v) e etanol 70 e 80% (v/v), mostrando as estruturas principais do fungo: hifas, esporos dispersos, conidióforos, medula e conídios. Imagem feita no Instituto de Química da UNESP Araraquara. Araraquara, 2018.

O cultivo de fungos filamentosos visando à obtenção de biomoléculas pode ser em estado sólido ou submerso. A característica da enzima produzida e seu rendimento estão ligados ao método de obtenção e produção da mesma (16). O cultivo em estado sólido ocorre na ausência de água livre e o crescimento do microrganismo e a secreção do produto ocorrem na superfície da fermentação (21). Apesar de alguns autores dizerem que o cultivo em estado sólido é mais vantajoso do que o cultivo submerso para fungos filamentosos, o primeiro apresenta limitações no controle de alguns parâmetros, tais como, temperatura, pH e oxigenação (22).

No cultivo submerso o microrganismo se desenvolve em meio líquido. Além de maior controle das variáveis anteriormente mencionadas, há maior homogeneidade do meio de cultura (16). De acordo com Gomes et al. (23), cerca de 90% dos processos biocatalíticos das indústrias são realizados em cultivo submerso.

A produção de lipases depende de vários fatores, dentre eles o pH, a composição do meio fermentado, a temperatura, a oxigenação e a agitação. O último contribui para a oxigenação e a homogeneidade do sistema. De acordo com Gomes et al. (23), a fonte de carbono é apontada como o principal fator na síntese de lipases pois estas são consideradas enzimas indutíveis, ou seja, a adição de lipídeos no meio de cultivo pode atuar como indutor da síntese de lipases. Os óleos mais comumente utilizados são oliva e soja (24–27), porém, alguns outros vêm sendo estudados devido as suas

características e a sua fonte de obtenção, como é o caso de óleos residuais de processos industriais (21,28,29).

No quadro 1 são apresentados alguns trabalhos realizados visando a obtenção de lipases por cultivo submerso, com diferentes espécies de fungos, bem como óleos empregados como indutor e fonte de carbono.

Quadro 1. Fontes de obtenção e os lipídios utilizados como indutores na produção de lipases fúngicas.

Gênero	Espécie	Óleo	Referência
<i>Aspergillus</i>	<i>carbonarius</i>	girassol e colza não refinado	(15)
A.	<i>flavus</i>	soja e oliva	(30)
A.	<i>flavus</i>	soja	(26)
A.	<i>japonicus</i>	girassol	(31)
A.	<i>nidulans</i>	farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de brassica, farelo de amêndoa e farelo de mostarda	(32)
A.	<i>niger</i>	soja e oliva	(30)
A.	<i>niger</i>	oliva, soja, banha, amendoim e girassol	(24)
A.	<i>tamarii</i>	coco, amendoim, gergelim, girassol, soja e oliva	(33)
A.	<i>terreus</i>	oliva	(34)
<i>Fusarium</i>	<i>verticillioides</i>	soja, canola, girassol, polpa de macaúba, semente de macaúba, amêndoa de macaúba, oliva, palma, gergelim, etc.	(35)
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	melaço de soja	(36)
<i>Penicillium</i>	<i>sp.</i>	oliva	(37)

Dentre os óleos empregados para a obtenção de lipases, o de soja e o de oliva são os mais estudados. Considerando que há uma vasta gama de

resíduos industriais oleaginosos, pesquisas de biorefinaria visando o aproveitamento destes compostos para a obtenção de produtos de alto valor agregado é de interesse. Assim, o óleo de semente de uva e de semente de algodão mostram-se uma boa opção.

O óleo de semente de algodão pode ser obtido a partir de resíduos da indústria têxtil, onde cerca de 62,5% dos subprodutos são as sementes, e destas, pode-se extrair aproximadamente 20% de óleo (38). De acordo com o relatório da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) da perspectiva agrícola para o período de 2016-2025 (39), a produção mundial de algodão alcançará quase 31 toneladas até 2025, sendo 12% maior que o período de 2013-2015 e crescimento de 2% ao ano em 10 anos.

Em relação ao óleo de semente de uva, estima-se que as sementes representam de 20 à 25% da biomassa produzida na indústria de vinhos (40). De acordo com Dwyer, Hosseinian e Rod (41), o teor de óleo que pode ser obtido por sementes de uva de cultivar vermelha é de 13,1-19,6% (v/m) e de cultivar branca é de 14,7-17,8% (v/m). Os óleos das sementes podem ser extraídos quimicamente com solventes (hexano) e o auxílio de Soxlet, mecanicamente por prensagem a frio ou a quente, sendo que extração a frio é um método que não utiliza produtos químicos e preserva a estrutura natural do óleo (28). Desta forma, o reaproveitamento das sementes, além de contribuir para a diminuição de lixo proveniente da indústria, aparece como uma alternativa aos óleos amplamente estudados, já que o óleo de semente de uva apresenta alta composição de ácidos graxos insaturados de

cadeia longa. De acordo com Bail et al. (42) o óleo de semente de uva possui cerca de 90% de ácidos graxos mono e poli-insaturados, sendo que o ácido linoleico (C18:2) representa de 58 a 78%. No trabalho realizado por Dobrev et al. (15) observou-se uma relação entre a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes no óleo utilizado na síntese de lipases extracelulares e sua atividade enzimática. Assim, o alto nível de ácido linoleico presente no óleo de semente de uva pode ser mais uma vantagem na síntese de lipases.

Além das pesquisas de produção e otimização dos processos de obtenção das enzimas, a partir da variação da composição do meio fermentado, por exemplo, pesquisas acerca da melhoria da estabilidade da enzima tem-se mostrado interessante devido às diversas possibilidades de sua empregabilidade na indústria. Desta maneira, processos de imobilização de enzimas são vastamente pesquisados (8,43–46) afim de que o emprego de enzimas em processos biocatalíticos seja melhorada e os biocatalizadores possam ser reutilizados, podendo reduzir custos do produto final.

1.3. Métodos de imobilização

Para aplicação das lipases, não somente na hidrólise de óleos e gorduras, mas para outros fins, a estabilidade é um fator imprescindível. De acordo com Rivero et al. (1), as enzimas possuem instabilidade quando em ambientes que não são os naturalmente encontrados, principalmente em

relação à temperatura e ao pH. Desta maneira, a fim de melhorar as condições de estabilidade e aumentar a eficiência dos processos enzimáticos, as enzimas podem ser imobilizadas em diferentes suportes (47).

Além da vantagem de a enzima poder ser mais estável do que na sua forma livre, a imobilização é um processo que permite que a enzima possa ser reutilizada por vários ciclos (48), reduzindo assim os custos dos processos.

Os métodos mais comuns de imobilização, encontrados na literatura, são por ligação covalente, encapsulamento, *cross-link*, adsorção e aprisionamento (49–55). Na figura 5 é mostrado um esquema desses métodos de imobilização, divididos entre métodos físicos e químicos de ligação entre a enzima e o suporte.

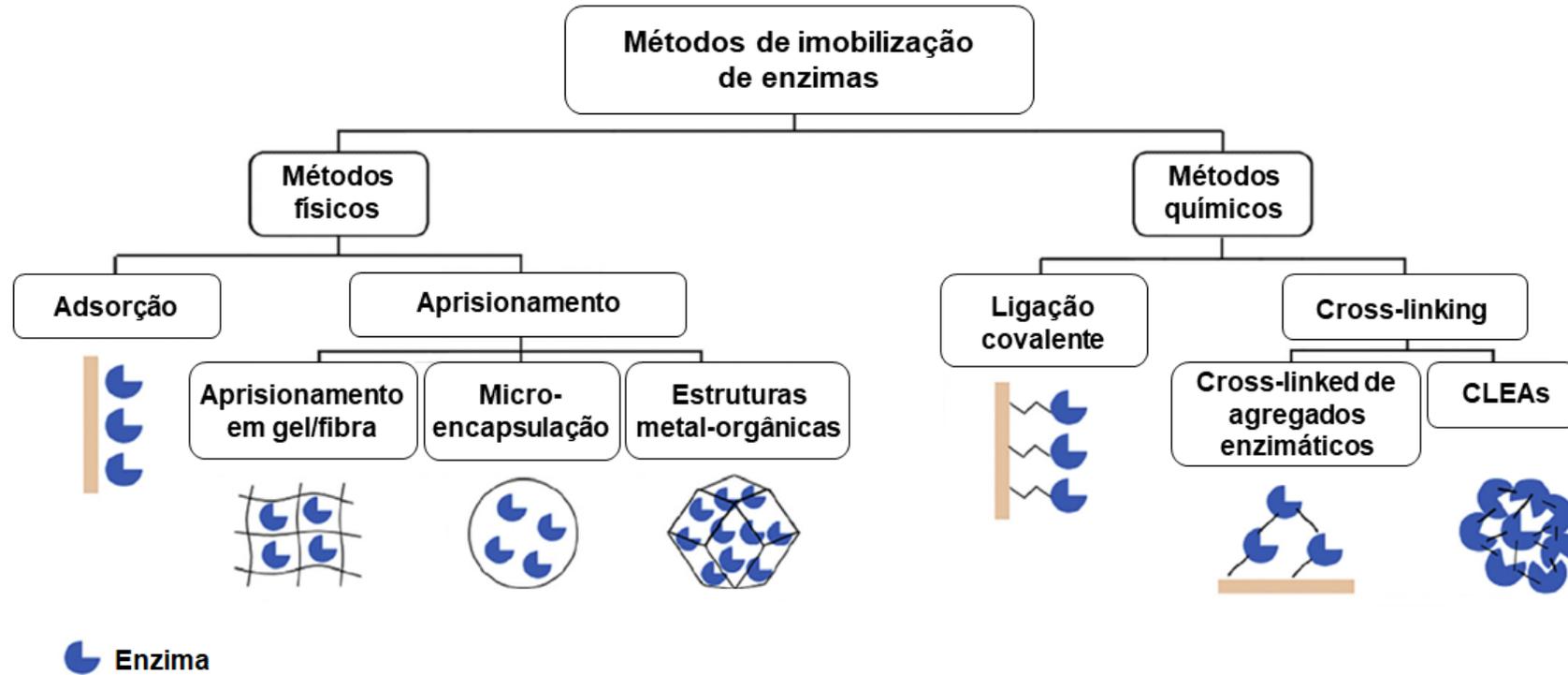


Figura 5. Métodos de imobilização de enzimas, divididos entre métodos físicos e químicos. Fonte: Adaptado de Liu, Chen e Shi (56). *CLEAs - Cross-linked Enzyme Aggregates

Ligação covalente é considerado o método mais comumente utilizado para imobilização de enzimas (56,57). Neste método, as ligações que ocorrem entre os aminoácidos das cadeias laterais da enzima com o material do suporte se dão pelos resíduos de lisina, cisteína ou por resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico (56,57). Apesar de ocorrer uma ligação forte entre a enzima e o suporte, melhorando sua estabilidade e reduzindo as chances da enzima se desligar do suporte durante a reação, o processo de imobilização pode ocorrer através dos aminoácidos situados no sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, ocasionar perda da atividade (56).

O método de imobilização por *cross-linking* ocorre através da interação entre enzimas e o reagente bifuncional, por ligações covalentes (56) sendo que o glutaraldeído é o reagente mais comumente utilizado, formando bases de Schiff com grupos amino da enzima (52), originando agregados de enzimas a partir do processo de *cross-link*. Outra forma de promover a imobilização por *cross-linking* é pela formação de CLEAs (em inglês "*Cross-linked Enzyme Aggregates*") onde, através de um processo anterior de precipitação, as enzimas se agregam e depois são submetidas ao *cross-link* com o reagente bifuncional (56). Ainda de acordo com Liu et al. (56) a agregação das enzimas pode causar a perda da atividade.

Em relação ao aprisionamento da enzima como forma de imobilização, Won et al. (50) definiram como o processo onde a enzima sofre restrição física por confinamento em um espaço ou rede, sendo que o alginato é o polímero mais utilizado devido à ausência de toxicidade. A ausência de ligações entre enzima e suporte preserva a estrutura da enzima,

diminuindo as chances de perda de atividade, porém, o maior problema desse método de imobilização é a difusão do substrato pelo gel/rede, que pode ser dificultada dependendo dos espaços disponíveis nas matrizes (56).

Desta forma, alguns processos de imobilização inviabilizam a ativação do sítio ativo da enzima, pois a interface hidrofóbica não tem acesso à enzima, como acontece em suportes de estrutura porosa (10). De acordo com Palomo et al. (10), a adsorção interfacial é um bom método de imobilização pois seu mecanismo é semelhante ao que acontece na ativação do sítio ativo. Isso ocorre devido à presença da tampa que recobre o sítio ativo da enzima. A adsorção visa um processo de imobilização onde a conformação aberta seja mantida e assim o sítio ativo se mantém livre para o acesso do substrato (58). O mecanismo de adsorção da lipase com a conformação aberta da tampa expondo o sítio ativo, em superfície hidrofóbica, é representado na figura 6.

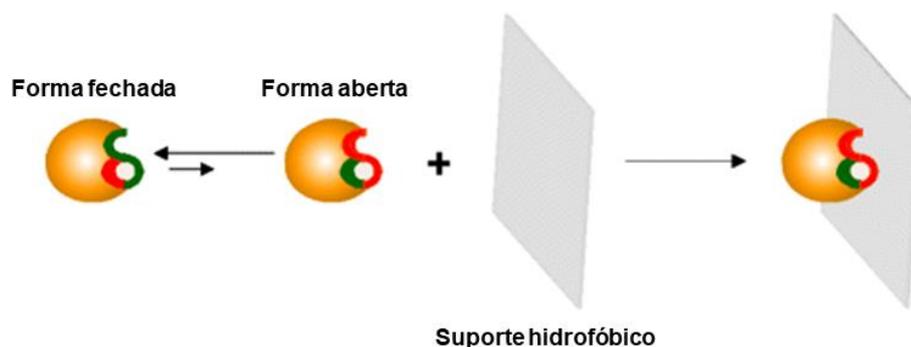


Figura 6. Representação da imobilização da lipase por adsorção interfacial, suporte de caráter hidrofóbico, com a conformação da tampa aberta. Fonte: Abreu Silveira et al. (59).

A imobilização por adsorção pode ocorrer por pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas ou hidrofóbicas (56), que são forças fracas de interação entre suporte e enzima (57,60). No trabalho de Volpato et al. (61), lipases de 45 e 28 kDa foram purificadas após dessorção do suporte glioxil utilizando 0,01% e 3% de triton X-100, respectivamente, com recuperação de 100% da atividade residual. Desta forma, a imobilização em suporte por adsorção pode ser positiva por ser um método reversível, onde o meio enzimático pode ser purificado em apenas uma etapa (9,61,62), podendo ser dessorvida a enzima do suporte, e ambos serem reutilizados, evitando descartes (51).

A escolha do método de imobilização é um fator importante pois deve ser considerado a especificidade da enzima e do suporte, o custo do procedimento, propriedades finais desejadas da enzima imobilizada e a toxicidade dos reagentes (57), por exemplo. Além disso, é importante considerar as relações entre o suporte-enzima-substrato-solvente, bem como o meio em que está presente o substrato (orgânico/aquoso), e as vantagens e desvantagens de cada método (63).

1.4. Aplicação de lipases na síntese de bioaromas

Nos dias de hoje há uma busca por alimentos, cosméticos e bebidas naturais devido à maior preocupação com a saúde. Os aromas naturais são utilizados para acrescentar odor aos alimentos, porém, a extração desses compostos de vegetais tem apresentado problemas no fornecimento, além

de apresentam alto custo, variação de qualidade e quantidade (64), o que torna esse processo inviável comercialmente (65).

De acordo com um relatório de *Markets and Markets* (66), estima-se que o mercado de aromas para a indústria de alimentos será de US\$ 13,56 bilhões em 2018, com previsão para alcançar os US\$ 17,10 bilhões até 2023, mostrando que está em crescimento devido à demanda crescente. A aplicação de enzimas na síntese biotecnológica de aromas aparece como uma alternativa já que os compostos produzidos apresentam alta pureza, reduzindo custos para purificação (67). Além disso, o uso de biocatalisadores, ao invés de reagentes químicos, é considerado ecologicamente correto, indo de encontro ao que se espera da “*química verde*”, que tem como objetivo a redução ou eliminação do uso de substâncias nocivas à saúde (68).

A reação de síntese de bioaroma, ésteres de cadeia curta, se dá a partir da esterificação de um álcool de cadeia curta com um ácido carboxílico, com formação do éster e água (65,67,68). A formação de ésteres aromatizantes são frequentemente formados por acetatos de etila, isobutila, amila e isoamila, e aditivos de perfumes por isopropila, benzila, octila, geranila, linanila e metila (68). Os biocatalisadores podem acelerar a velocidade da reação favorecendo o processo.

Alguns exemplos dos aromas que podem ser obtidos a partir da esterificação podem ser vistos no Quadro 2.

Quadro 2. Exemplos de aromas que podem ser obtidos por diferentes ésteres. Fonte: Bezbradica et al. (69)

Éster	Aroma
Acetato de amila	maçã, banana
Acetato de etila	abacaxi
Acetato de isoamila	pêra, banana
Acetato de isobutila	cereja, framboesa, morango
Acetato de metila	menta
Acetato de octila	laranja
Acetato de propila	pêra
Butirato de amila	morango, pêra, abacaxi, damasco
Butirato de butila	abacaxi
Butirato de etila	banana, abacaxi, morango
Butirato de geranila	cereja
Butirato de metila	maçã, abacaxi
Caproato de etila	morango
Caprilato de nonila	laranja
Formato de etila	limão, morango
Formato de isobutila	framboesa
Heptanoato de etila	cereja, damasco, framboesa
Isobutirato de amila	banana
Isobutirato de etila	morango
Isovalerato de etila	maçã
Isobutirato de propila	rum
Propionato de etila	abacaxi
Salicilato de metila	pervinca
Valerato de amila	uvas, maçã
Valerato de etila	maçã, banana
Valerato de geranila	maçã
Valerato de metila	flor

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi o estudo da produção de lipase a partir do cultivo submerso de *Aspergillus sp.* DPUA 1727, avaliando a adição de diferentes óleos no meio fermentado e outros

parâmetros da produção, como quantidade de inóculo no meio fermentado e tempo de fermentação. Posteriormente, a enzima produzida foi caracterizada antes e após a imobilização em suporte hidrofóbico octil-sepharose em relação à influência da temperatura e do pH na atividade da enzima e capacidade de reuso do derivado imobilizado. Como última etapa do trabalho, empregou-se a enzima imobilizada como biocatalisador visando à obtenção de propionato de isoamila, éster produtor de aroma de damasco e abacaxi.

Capítulo 1.

**Valorização biotecnológica de óleos de resíduos agroindustriais para
produção de lipases utilizando *Aspergillus sp.* DPUA 1727 da
Amazônia.**

Biotechnological valorization of oils from agro-industrial wastes to produce lipases using *Aspergillus* sp. DPUA 1727 from Amazon.

Artigo publicado na revista *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* (traduzido para o português e adaptado para a Tese).

Mariana Vendrasco Tacin^a

Fernanda Pelisson Massi^b

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro^b

Maria Francisca Simas Teixeira^c

Ariela Veloso de Paula^a

Valéria de Carvalho Santos Ebinuma^a

^a Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, Brasil.

^b Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^c Coleção de culturas DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

Resumo

As lipases são enzimas com grande número de aplicações à nível industrial. Os maiores desafios industriais atuais são novos produtores e um bioprocessos com alta produtividade. Em relação ao processo de produção, os óleos provenientes de resíduos agroindustriais podem ser utilizados como indutores eficientes de enzimas lipolíticas, reduzindo o custo de produção. Além disso, esse processo pode minimizar os problemas ambientais relacionados ao descarte agroindustrial. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma nova espécie de *Aspergillus sp.* DPUA 1727, isolada da floresta Amazônica, como produtora de lipase, utilizando óleos de resíduos agroindustriais (óleo de semente de uva (OSU) e óleo de semente de algodão (OSA)) como indutores. Empregou-se azeite e óleo de soja como padrões. O microrganismo metabolizou todos os óleos estudados; no entanto, os óleos com maior porcentagem de ésteres de ácidos graxos (> 80%), ou seja, soja, oliva e OSU, promoveram a maior produção de lipase. Ao comparar a atividade da lipase produzida, OSU gerou uma atividade enzimática 2 vezes maior do que OSA. A enzima produzida usando OSU foi caracterizada e pré-purificada por precipitação. Em conclusão, um novo isolado *Aspergillus sp.* DPUA 1727 pôde produzir lipase para fins industriais usando OSU. Além disso, outros óleos de resíduos agroindustriais com alta porcentagem de ésteres de ácidos graxos podem ser usados como indutores para a produção de lipases.

Palavras-chave: biorefinaria; lipases; resíduos agroindustriais; *Aspergillus*; óleo de semente de uva; cultivo submerso.

1. Introdução

As lipases (EC 3.1.1.3.) são enzimas hidrolases, também chamadas de glicerol ésteres hidrolases, com a função natural de hidrólise de triglicerídeos em meio aquoso, formando glicerol e ácidos graxos. Devido às suas características, essas enzimas podem ser aplicadas na produção de detergentes, cosméticos, tratamento de água, biorremediação, indústria oleoquímica, produção de lipídios estruturados (1–3), entre outros, substituindo compostos sintéticos ou explorando novas áreas.

Em 2016, o valor de mercado global das enzimas industriais atingiu US\$ 5 bilhões, sendo as lipases responsáveis por 10% desse mercado (4). Essas enzimas correspondem ao terceiro maior grupo do mundo em vendas (5). Em adição, espera-se uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) do mercado de enzimas de 4,7% ao ano, aumentando de US\$ 5,0 bilhões para US\$ 6,3 bilhões de 2016 para 2021 (6). Desta forma, o mercado de enzimas é interessante e como as lipases correspondem a uma importante porcentagem deste mercado, novas fontes e métodos de produção são de grande interesse industrial. As lipases podem ser produzidas por animais, plantas e microrganismos, porém, enzimas de origem microbiana apresentam-se mais estáveis, com especificidade de substrato e com menor custo de produção em comparação a outras fontes (7). A maior estabilidade pode estar relacionada com a estrutura química da enzima quando obtidas por processos fermentativos. Além disso, do ponto de vista econômico e industrial, as lipases microbianas têm vantagens devido ao processo

fermentativo (8), que pode ser realizado em estado sólido ou por cultivo submerso. No cultivo submerso, o microrganismo se desenvolve no meio líquido, e fatores como temperatura, pH, fonte de carbono e nitrogênio, a presença de indutores, entre outros, podem interferir no processo de produção (9). Embora na literatura existam vários estudos avaliando a produção de lipase em meios de cultura utilizando diferentes óleos como fonte de carbono e/ou indutor (óleo de soja (10,11,12), oliva e girassol (11,12,13), milho (11) banha, amendoim (12), coco, palma, sálvia, amêndoa, mostarda, mamona, gergelim (13)), ainda há interesse em estudos utilizando óleos vegetais de fontes alternativas, principalmente, resíduos agroindustriais. Óleos provenientes de resíduos agroindustriais são um problema ambiental, pois a maior parte é descartada por queima, descarga ou aterro não planejado, criando diferentes problemas (14); logo a valorização destes resíduos é de interesse industrial. O óleo de semente de uva (OSU) é um resíduo da indústria vinícola (15), enquanto o óleo de semente de algodão (OSA) é um resíduo da indústria do algodão (16). Ambos os óleos são compostos por ésteres de cadeia longa de ácidos graxos (17), sendo óleos ricos em ácido linoleico e oleico (15,18,19). Assim, podem ser usados como uma alternativa aos óleos de soja e azeite extensivamente estudados, e outros acima mencionados, para produzir lipases.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de lipases por cultivo submerso utilizando uma nova cepa de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 isolada da floresta Amazônica, utilizando óleos

de resíduos agroindustriais (OSU e OSA) como fonte de carbono e indutor enzimático. A enzima produzida utilizando OSU foi caracterizada em relação ao pH e temperatura, e estudos de pré-purificação por precipitação também foram realizados. Os objetivos propostos no presente estudo são de grande interesse em termos industriais, pois visam valorizar um resíduo industrial produtor de lipase, enzima com inúmeras aplicações industriais.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

A peptona bacteriológica e o ágar batata dextrose (BDA) foram adquiridos da Acumedia®. O óleo de oliva (Carbonell®) e o de soja (Soya®) foram adquiridos em mercado local de Araraquara, São Paulo, Brasil enquanto os óleos de semente de uva e de semente de algodão foram adquiridos da Distriol®. O substrato *p-nitrofenil palmitato* (*pNPP*) foi adquirido da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Manutenção do microrganismo

O fungo DPUA 1727 foi generosamente cedido pela Coleção de Cultura da Universidade Federal do Amazonas, DPUA, AM, Brasil. As culturas estavam preservadas em água destilada, na forma de esporos, e foram reativadas em ágar batata dextrose (BDA) suplementado com extrato

de levedura e mantido à 30°C por 7 dias. Após este período, as culturas foram mantidas em refrigerador à 4°C. O inóculo foi preparado em placas de BDA, e as culturas foram mantidas nas mesmas condições da reativação. O meio BDA continha a seguinte composição (g/L, em água deionizada): ágar batata dextrose (39,0) e extrato de levedura (5,0).

2.3. Identificação do fungo

O DNA genômico total dos fungos foi isolado usando o BioPur Mini Spin Extraction Kit® (Biometrix, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Uma porção do gene da calmodulina (CaM) foi amplificada usando o par de *primers* cmd5/cmd6 (20). A PCR foi realizada em 25 µL de mistura reacional contendo um tampão 1×PCR, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 mM de mistura de dNTP (Invitrogen, Life Technologies), 0,4 µM de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies) e 10 ng de modelo de DNA. As condições de ciclos térmicos de desnaturação foram de 95°C por 5 minutos, seguidos por 34 ciclos de PCR (94°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min) e uma extensão final a 72°C por 5 min. O amplicon de PCR foi purificado usando ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) e submetido a sequenciamento direto em ambas as direções usando um kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, EUA). O produto da reação foi processado no equipamento ABI 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). A sequência obtida foi comparada usando a Ferramenta de Busca de

Alinhamento Local Básica (21) contra o GenBank verificando as “sequências do tipo material” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Além disso, a sequência obtida foi alinhada por um algoritmo ClustalW com as sequências de cepas de todas as espécies da seção *Nigri* de *Aspergillus* disponíveis na base de dados do NCBI. Uma árvore *Maximum Likelihood (ML)* foi construída, com 1000 réplicas de bootstrap, usando o software MEGA7 (22).

2.4. Produção de lipase por cultivo submerso

Para o cultivo submerso, frascos tipo Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio de cultura foram inoculados com 5 discos de micélio (8 mm de diâmetro) da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727. A incubação ocorreu por 72 h à 30°C e 150 rpm em shaker orbital. Após esse período, o caldo fermentado foi filtrado com auxílio de funil de Buchner em porcelana usando filtro de papel de 80 g.m⁻² (Whatman, UK). A biomassa foi determinada por peso seco empregando balança de umidade (Shimadzu® MOC-63U). O filtrado livre de células foi usado para medir a atividade da lipase (seção 2.7.1), proteínas totais (seção 2.7.2) e pH (em pHmetro).

Inicialmente, óleos de soja, oliva, semente de uva e semente de algodão foram avaliados como fonte de carbono e indutor. Para isso, o meio continha a seguinte composição: 20,0 g/L peptona bacteriológica, 0,6 g/L MgSO₄.7H₂O, 1,0 g/L KH₂PO₄, 1,0 g/L NH₄NO₃ e 8,0 mL/L de óleo. O experimento foi realizado em triplicata e o pH inicial do meio fermentado foi ajustado para 6,3. Subsequentemente, a produção de lipase ao longo do

tempo foi estudada nas mesmas condições descritas acima, porém, avaliando apenas o óleo de semente de uva por um período de 120 h. Amostras foram retiradas após 24, 48, 72, 96 e 120 h do processo de fermentação.

2.5. Estudos de estabilidade da lipase

Primeiramente, foram determinados o pH e a temperatura ótimos da lipase presente no meio fermentado. A dosagem da atividade em relação ao pH foi realizada num intervalo de pH de 3 a 10 diluindo o meio fermentado contendo a enzima, no respectivo tampão, na proporção de 1:1, à 37°C. Os tampões utilizados foram: pH 3, 4, 5 e 6 - tampão McIlvaine 0,1 M; pH 7 e 8 - tampão fosfato 0,1 M; pH 9 e 10 - tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M. A temperatura ótima foi determinada em ensaios nas temperaturas de 20 a 60°C, com o tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 no preparo do reagente da dosagem de atividade (seção 2.7.1.), utilizando o meio fermentado contendo a enzima.

Em seguida, a estabilidade da lipase presente no meio fermentado sob várias condições de pH (3 a 10 a 25°C, tampões citados acima) e temperaturas (de 20 a 60°C a 0,1 M de tampão fosfato pH 7,5) foi estudada. Em ambos os experimentos o caldo fermentado foi diluído no tampão na proporção de 1:1 e as soluções foram incubadas em banho termostaticado (modelo 521/2DE, New Ethics, SP, Brasil) durante 48 h. Alíquotas foram tiradas após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação.

Para todos os estudos de estabilidade, a atividade relativa da lipase (% RA) foi determinada de acordo com a Eq. 1:

$$RA = \frac{LA}{LA_0} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde: LA e LA_0 são as atividades da lipase (U.mL^{-1}) após o tempo de incubação e atividade enzimática inicial, respectivamente.

2.6. Pré-purificação da lipase

2.6.1. Precipitação com sulfato de amônia

A precipitação com sulfato de amônia foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bharti et al. (23), com modificações. O caldo fermentado sem células foi precipitado utilizando sulfato de amônia a 80% de saturação (m/v), mantido sob agitação *overnight* à 4°C e depois centrifugado à 9000 rpm durante 15 min a 4°C em centrífuga refrigerada (Thermo Scientific Sorvall Legend). Subsequentemente, o precipitado foi ressuspenso em 6 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5) e dialisado utilizando membrana de diálise (limite de exclusão: 10.000-12.000 Da) durante 48 h a 4°C. A solução tampão foi substituída a cada 6 horas. Posteriormente, o precipitado dialisado foi ressuspenso em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), na concentração final de 1 g.mL^{-1} , para determinação da atividade enzimática (seção 2.7.1) e proteínas totais (seção 2.7.2).

2.6.2. Precipitação com solventes orgânicos

Utilizou-se acetona e etanol para precipitar a lipase. O protocolo utilizado para ambos os solventes foi baseado no trabalho de Yadav et al. (24), com modificações. Os testes foram realizados pela adição de solventes, pré congelados à -18°C , de 1 à 4 vezes o volume do caldo fermentado filtrado (para cada solvente) e levados ao ultra freezer a -80°C por 4 horas. Após a incubação, a solução foi centrifugada a 9000 rpm, por 15 min a 4°C , em centrífuga refrigerada (Hitachi CR22N Shimadzu®). O precipitado foi ressuspenso em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), para uma concentração final de $2,5 \text{ g.mL}^{-1}$ e determinou-se a atividade enzimática e proteínas totais.

Para os cálculos de atividade específica (U.mg^{-1} de proteínas) e fator de purificação, foram utilizadas para ambas as metodologias de purificação as Eq. 2 e 3, respectivamente:

$$\text{Atividade específica (U.mg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{atividade enzimática (U. mL}^{-1}\text{)}}{\text{proteínas totais (mg.mL}^{-1}\text{)}} \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Fator de purificação} = \frac{\text{atividade específica da enzima purificada (U.mg}^{-1}\text{)}}{\text{atividade específica do meio fermentado (U.mg}^{-1}\text{)}} \quad \text{Eq. 3}$$

2.7. Métodos analíticos

2.7.1. Atividade da lipase

A atividade da lipase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Mayordomo et al. (25), com modificações. A reação foi realizada

pela adição de 250 μ L de uma solução contendo 200 mg de Triton X-100, 50 mg de goma arábica e 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,5) para um volume total de 50 mL, 250 μ L de solução enzimática (meio fermentado filtrado e solução nos ensaios precipitados) e 45 μ L de solução contendo 15 mg de *p*-nitrofenil palmitato (*pNPP*) diluído em 10 mL de isopropanol. A reação foi mantida em banho à 40°C por 30 min. Após, 0,5 mL de Trizma base 2% (m/v) foi adicionado para parar a reação. A quantificação da atividade foi feita pela liberação de *p*-nitrofenol (*pNP*), que produz coloração amarela, quantificada pela absorbância à 398 nm em leitor de placas (EnSpire® PerkinElmer). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de *pNPP* por minuto sob as condições descritas.

2.7.2. Análise de proteínas

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Lowry (26), no comprimento de onda de 595 nm, em leitor de placas (EnSpire PerkinElmer®). A quantidade de proteínas foi definida a partir da equação da reta da curva padrão utilizando soroalbumina bovina ($y=0,9144x+0,1337$), com valor de $R^2= 0,6287$.

2.7.3. Análise de eletroforese SDS-PAGE

As análises de eletroforese foram feitas baseadas no método de Laemmli (27). O gel foi feito com 10% de poliacrilamida pela aplicação de 20 μ L de amostras em cada poço e 2 μ L de marcador de peso molecular de 10kDa.

2.7.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram feitas a partir do inóculo de *Aspergillus sp.* em placa de BDA, cultivada por 7 dias. Os discos de micélio foram removidos e fixados em uma placa de fundo plano, com glutaraldeído a 5% (v/v). Após secagem durante 5 dias à temperatura ambiente, os poços foram lavados com etanol 70 e 80% (v/v) para remover o excesso de esporos para melhor visualização das estruturas. As amostras foram analisadas no Instituto de Química da Unesp de Araraquara, em microscópio eletrônico de varredura do JEOL (modelo JSM-7500F, software operacional PC-SEM v. 2.1.0.3), equipado com detectores secundários de elétrons, retrodifusão e análise química espectroscopia de dispersão - EDS) da Thermo Scientific (modelo Ultra Dry, software de operação NSS 2.3).

2.7.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico IBM SPSS® versão 21.0. Os resultados experimentais foram

apresentados pelos valores médios das triplicatas e desvios-padrão das médias. Para verificar a igualdade entre as médias, o teste estatístico utilizado foi ANOVA *one-way*, com correção de Welch para variâncias desiguais, com nível de significância de 5% e pós-teste de Tukey.

3. Resultados e discussões

3.1. Identificação do fungo

Embora a região interna do espaçador rDNA transcrito (ITS1-5.8S-ITS2) seja o código de barras oficial do DNA para fungos (28), ele não contém variação suficiente para distinguir entre todas as espécies de *Aspergillus* da seção *Nigri*. Assim, como recomendado por alguns autores (29,30), foram utilizadas sequências de DNA do gene que codifica a calmodulina (CaM) para identificar o isolado fúngico aqui estudado. Este tipo de sequência é útil para identificação em nível de espécie em certas linhagens de fungos tais como *Aspergillus*, um dos gêneros mais prolíficos de fungos para metabólitos secundários e que incluem numerosas espécies medicinalmente e industrialmente importantes (29). A sequência do gene CaM obtida no presente estudo para a cepa DPUA 1727 foi mais semelhante à espécie do tipo *Aspergillus costaricensis* (I = 99%), com base na pesquisa BLASTn verificando as "sequências do tipo material". A árvore filogenética baseada em CaM reconstruída com a sequência obtida para a cepa DPUA 1727 e as obtidas do banco de dados GenBank para cada

espécie colocada em *Aspergillus* da seção *Nigri* é apresentada na Figura 1. O isolado DPUA 1727 foi reconhecido filogeneticamente como um membro da espécie *A. costaricensis*. *A. costaricensis* é uma espécie bisserita (Epíteto: *costaricensis*) que foi primeiramente isolada do solo na Costa Rica (30). Não é uma espécie produtora de ocratoxina e pode ser especialmente interessante para a exploração biotecnológica (30). No meio CYA a colônia de *A. costaricensis* apresenta cor preta e colônia reversa cor de palha (31). A cepa DPUA 1727 apresenta filogenia muito semelhante a *A. costaricensis*, no entanto, provavelmente é uma nova cepa que foi isolada do solo da Amazônia. Portanto, neste trabalho, o microrganismo foi chamado de *Aspergillus* sp. DPUA 1727 ao longo de todo o trabalho. A Figura 2 apresenta a morfologia do microrganismo na placa BDA (A), observada por microscopia óptica (B) e por microscopia eletrônica de varredura (C e D).

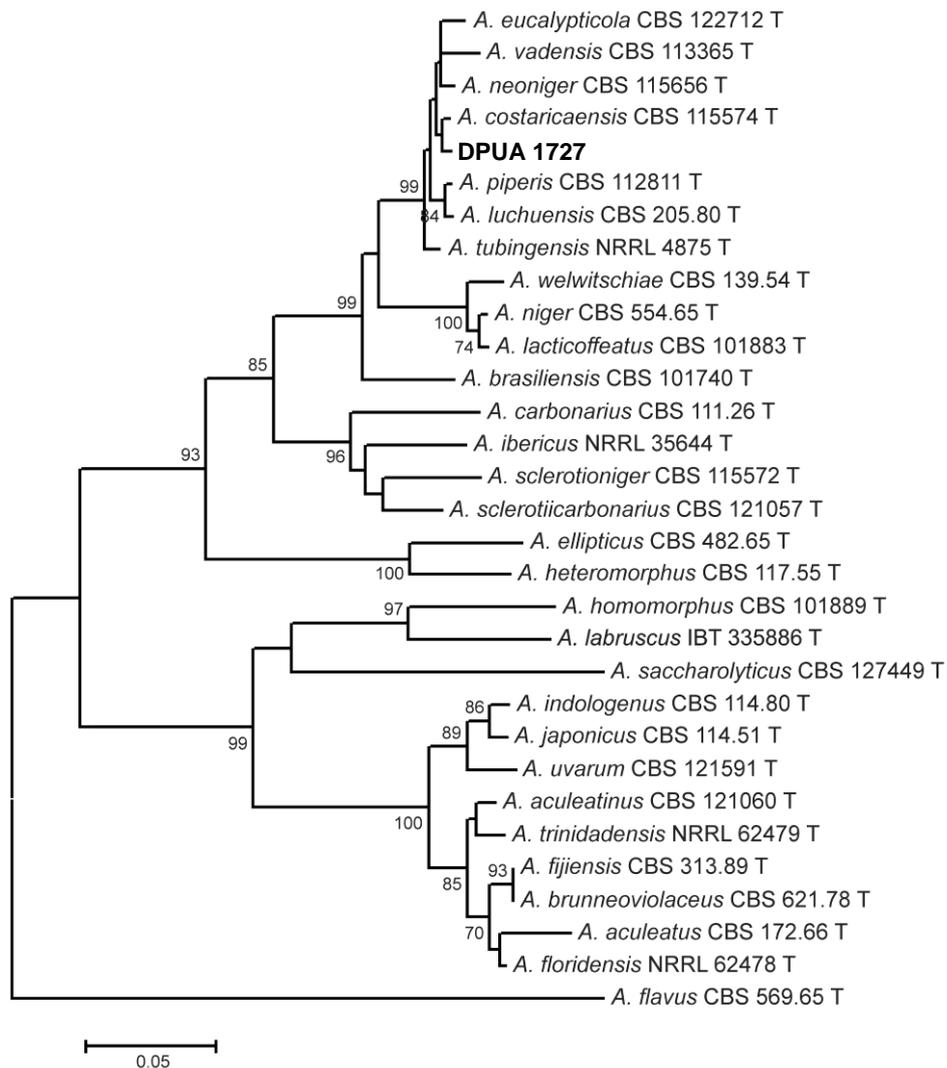


Figura 1. Árvore filogenética baseada em calmodulina para *Aspergillus* sp. DPUA 1727 mostrando fungos familiares (modelo de dois parâmetros Kimura; algoritmo de máxima verossimilhança). Valores de bootstrap (1.000 repetições) maiores que 70% são listados.

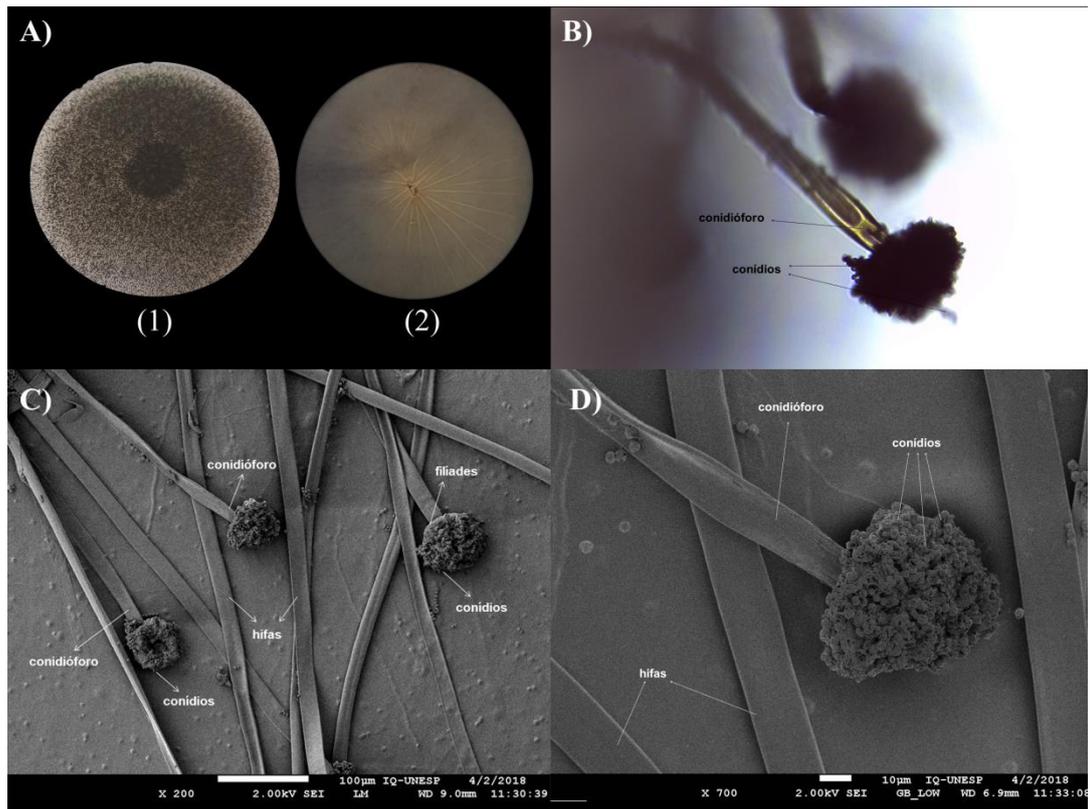


Figura 2. Imagens de *Aspergillus sp. DPUA 1727* A) crescimento por 7 dias em placa BDA, B) conidióforo e conídios via microscopia óptica e C e D) hifas e conidióforos, desidratados após tratamento com etanol a 70 e 80%, conídios, esporos e filíades vistos por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Araraquara, 2018.

3.2. Efeito de diferentes óleos na biossíntese de lipases

Microrganismos requerem uma fonte de carbono e nitrogênio para o seu crescimento e biossíntese de produtos. No caso da biossíntese da lipase por um microrganismo, é necessária a presença de um indutor, tal como uma gordura ou óleo que tenha suas ligações éster quebradas liberando ácidos graxos livres (32). O indutor também pode ser usado como a principal fonte de carbono do microrganismo (32). O estudo de um processo alternativo de produção de lipase por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp. DPUA 1727* utilizando óleos de resíduos agroindustriais, OSU e OSA, foi

realizado. Os resultados da atividade hidrolítica da lipase com OSU e OSA foram comparados com os indutores convencionais soja e azeite (10,12). Estes resultados são apresentados na Tabela 1, que apresenta ainda os resultados de pH e biomassa ao final do cultivo.

Tabela 1. Atividade hidrolítica da lipase, pH e biomassa obtidos por cultivo submerso de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 utilizando os seguintes óleos: semente de algodão (OSA), semente de uva (OSU), oliva (OO) e soja (OS).

Óleos	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)
Semente de algodão	7,7 ± 1,3 ^c	3,7 ± 0,1 ^a	8,8 ± 0,9 ^a
Semente de uva	13,5 ± 1,1 ^b	3,9 ± 0,2 ^a	7,0 ± 0,1 ^b
Oliva	14,4 ± 0,6 ^b	3,6 ± 0,1 ^a	7,2 ± 0,4 ^b
Soja	17,9 ± 0,8 ^a	3,6 ± 0,4 ^a	7,7 ± 0,7 ^{ab}

Teste estatístico Anova one way (com correção de Welch correction para variâncias desiguais) e pós-teste de Tukey. Os resultados são apresentados pelas médias e desvios-padrões das triplicatas. Letras iguais representam valores iguais à nível de significância de 5%.

Entre os indutores avaliados, a atividade da lipase diminuiu de acordo com a seguinte sequência: OS > OO = OSU > OSA. O resultado obtido pode estar relacionado com o tamanho da cadeia carbônica presente no ácido graxo de cada óleo estudado (13,33). A Tabela 2 mostra os principais componentes em termos de ácidos graxos de cada óleo utilizado.

Tabela 2. Composição percentual em ácidos graxos de cadeia longa, e insaturados, dos óleos de semente de algodão, semente de uva, oliva e soja, usados na biossíntese de lipase.

Óleo	Esteárico C18	Oléico C18:1	Linoléico C18:2	Linolénico C18:3	Araquidônico C20
Semente de algodão**	2,00	35,00	42,00	----	----
Semente de uva*	3,50	14,30	74,70	0,15	0,16
Oliva*	2,30	66,40	16,40	1,60	0,43
Soja**	2,00-6,00	22,00-34,00	43,00-56,00	5,00-11,00	----

* Orsavova et al. (34)

**Chempro (available in <http://www.chempro.in/fattyacid.htm>)

Como pode ser visto na Tabela 2, a porcentagem de ácidos graxos insaturados de cadeia longa nos óleos é de, aproximadamente, 89, 85, 84 e 77% (v/v) para óleo de semente de uva, soja, oliva e algodão, respectivamente. Estes valores foram calculados considerando a média entre os valores mínimo e máximo de cada ácido graxo C18:n mostrado na Tabela 2. Desta forma, o valor real pode ter variações entre esses extremos. A biossíntese da lipase foi mais pronunciada em óleos com alta quantidade (> 80%) de ácidos graxos C18:n. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Lakshmi et al. (17), que estudaram a produção de lipase por *Candida rugosa*. Neste trabalho, a quantidade de lipase produzida também apresentou correlação com a porcentagem relativa de ésteres de ácidos graxos C18:n presentes nos óleos utilizados (óleos de gergelim, amendoim, girassol, palma, coco e mamona). Dobrev et al. (33) estudaram diferentes óleos vegetais (girassol, soja, oliva, colza, milho e sabão de óleo de girassol) na produção de lipase por *A. carbonarius* e observaram que quanto maior o teor de ácidos graxos livres no óleo, maior foi a produção de lipase. Os autores avaliaram a influência do óleo de girassol e o sabão de óleo de girassol, ambos apresentaram atividade superior nos testes anteriores, na concentração de 15 g.L⁻¹. A atividade da lipase com sabão como fonte de carbono foi 4 vezes maior do que com o óleo de girassol. O sabão de óleo de girassol apresenta em sua composição 89,31% de ácidos graxos insaturados (linoleico e oleico). Segundo os autores, a presença de ácidos graxos com comprimento de cadeia superior a 16 átomos de carbono em óleos afeta positivamente a biossíntese de lipases. O processo

de biossíntese das lipases durante o metabolismo dos microrganismos não é bem compreendido (24). No entanto, a estrutura da lipase e, conseqüentemente, sua especificidade parece ser dependente do metabolismo do microrganismo. Sabe-se que, em relação ao ácido graxo, a lipase pode apresentar afinidade por ácidos graxos de cadeia curta (até 10 carbonos), outros por ácidos graxos insaturados e outros são inespecíficos (35). Ácidos graxos insaturados apresentam ligações duplas que, após a quebra, geram estrutura de cadeias de etileno. Ácidos graxos saturados apresentam uma estrutura compacta (36). Portanto, os ácidos graxos insaturados são mais fáceis de serem hidrolisados. A Figura 3 apresenta uma relação entre a porcentagem de ácidos graxos C18:n presentes em cada óleo utilizado e a atividade enzimática alcançada nas condições experimentais.

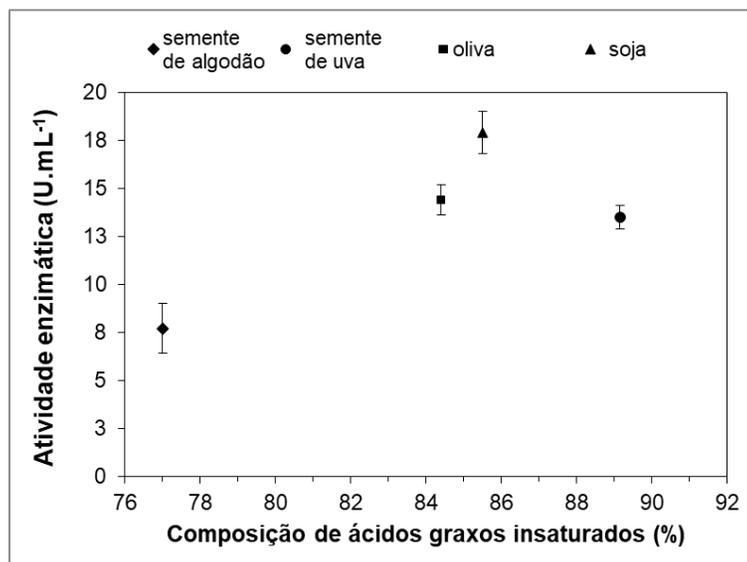


Figura 3. Correlação entre a composição de ácidos graxos (%) dos diferentes óleos utilizados e a atividade enzimática (U.mL⁻¹) da lipase produzida.

Em geral, a atividade da lipase foi mais pronunciada com óleos que apresentaram teor de ácidos graxos insaturados superior a 80%, nomeadamente, OS, OO e OSU. Além disso, a biossíntese das lipases foi mais favorecida pelo ácido graxo insaturado do que pelo comprimento da cadeia de ácidos graxos. Sabe-se que os microrganismos ajustam sua atividade metabólica de acordo com o ambiente, conseqüentemente, a quantidade de enzima produzida pode mudar de acordo com este fator.

Considerando a especificidade da lipase, essas enzimas podem ser agrupadas em lipases regiosseletivas sn-1,3 (produzindo mais 1(3), 2-diacilglicerol que 1,3-diacilglicerol), lipases regiosseletivas sn-2 (produzem mais 1,3-diacilglicerol do que 1 (3), 2-diacilglicerol) e lipases não seletivas (sem seletividade para ambas as posições) (37). A especificidade enzimática não pode ser determinada com os resultados apresentados, no entanto, estudos preliminares (dados não apresentados) mostraram que no meio fermentado há a presença majoritariamente de diacilglicerol, o que é um indicativo de que a enzima é sn-2 específica.

Em relação aos demais parâmetros de fermentação, OSA e OS promoveram um crescimento 25% maior que as demais fontes. Os valores de pH dos filtrados enzimáticos com todos os óleos apresentaram valores estatisticamente iguais ($p= 0,358$) ao final da fermentação, em torno de 3,7. Como o pH inicial foi de 6,3, houve uma acidificação do meio, provavelmente devido à hidrólise dos óleos triglicérides com conseqüente liberação de ácidos graxos no meio e queda no valor do pH.

Embora o meio fermentado obtido com OS tenha apresentado uma atividade enzimática da lipase 1,33 vezes maior que o obtido com OSU, este trabalho foi focado na avaliação de resíduos, principalmente agroindustriais. Como já mencionado, OS e OO foram utilizados como padrão, pois seu uso como indutor de lipase é bem descrito na literatura (10,38–40). Desta forma, o OSU surge como uma fonte de carbono e de indução na produção de lipase por cultivo submerso de *Aspergillus*. Na indústria do vinho, estima-se que de 20 a 25% da biomassa gerada seja proveniente das sementes, que são descartadas (41) e sua reutilização é de interesse industrial, além de reduzir o descarte de resíduos diminuindo problemas ambientais. O óleo obtido das sementes de uva possui alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), representando cerca de 85-90% da composição total; dentre eles o ácido linoleico (C18:2), abundantemente presente em óleos vegetais, e o ácido linolênico (C18:3) (15). Como visto anteriormente, essas características são positivas na indução da produção de lipases. Além disso, não há relatos na literatura utilizando óleo de semente de uva para produção de lipases microbianas até o presente estudo.

Com o objetivo de estudar o comportamento do microrganismo e a produção de lipase empregando OSU, foi avaliada a produção de lipase pela cepa de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 ao longo do tempo. Os dados de atividade hidrolítica ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), atividade específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$), pH do filtrado enzimático e biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) estão apresentados na Figura 4.

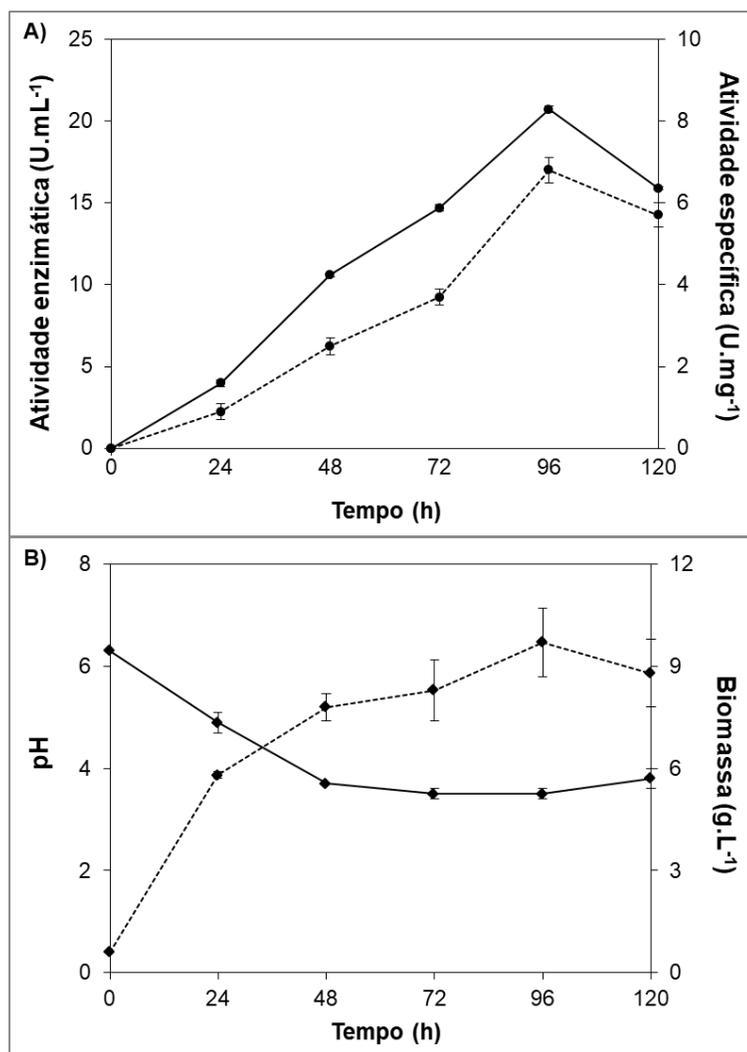


Figura 4. Resultados da atividade enzimática (U.mL⁻¹) (linha cheia) e atividade específica (U.mg⁻¹) (linha tracejada) ao longo do cultivo submerso durante 120 horas da cepa *Aspergillus sp. DPUA 1727* (A); Curva de crescimento da cepa *Aspergillus sp. DPUA 1727* em cultivo submerso durante 120 horas (g.L⁻¹) (linha tracejada) e pH do filtrado enzimático (linha cheia) (B). As barras de erro representam intervalo de confiança de 95% para as medidas.

O crescimento médio do microrganismo por dia foi de 25% até atingir o máximo após 96h de cultivo submerso. Após 24 h de cultivo, houve um aumento de 9,7 vezes na biomassa produzida, e a quantidade obtida com 96h de produção foi 16,2 vezes maior quando comparada ao tempo zero. Segundo

Dalmau et al. (42), geralmente no final da fase exponencial de crescimento ocorre a produção de lipase extracelular no meio de cultura, o que pode estar relacionado à necessidade de maior tempo de cultivo para ocorrer a máxima liberação da enzima do interior celular para o meio extracelular. Esse comportamento foi mais acentuado na presença de óleo de semente de algodão. No entanto, deve-se considerar que um maior tempo de processo poderá reduzir a produtividade, não sendo uma alternativa interessante.

Em relação à enzima lipolítica, a maior atividade hidrolítica da lipase ($20,7 \text{ U.mL}^{-1}$) e atividade específica ($6,8 \text{ U.mg}^{-1}$) também foi obtida após 96 h de fermentação. A atividade da lipase aumentou com o tempo como consequência do metabolismo do microrganismo e do acúmulo de enzimas no caldo fermentado. A partir dos resultados obtidos, fica claro que 96 h do processo de fermentação foi o ideal para a produção de lipase, pois aumentou a atividade enzimática em torno de 41% e a produtividade da biomolécula alvo ($0,22 \text{ U/mL.h}$). Desta forma, o óleo de semente de uva proporcionou os melhores resultados de produção e a enzima produzida nessa condição foi caracterizada como apresentado a seguir.

3.3. Caracterização da lipase produzida pela cepa Aspergillus sp. DPUA 1727 utilizando óleo de semente de uva como fonte de carbono: efeito do pH e temperatura

Os principais constituintes das enzimas são os aminoácidos, e mudanças no ambiente, como pH e temperatura, podem afetar sua estrutura e, conseqüentemente, sua atividade (43). Portanto, é essencial caracterizar a enzima em termos de pH e temperatura antes de sua aplicação. A Figura 5 apresenta os resultados obtidos para pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) após os seguintes tempos de incubação: 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h.

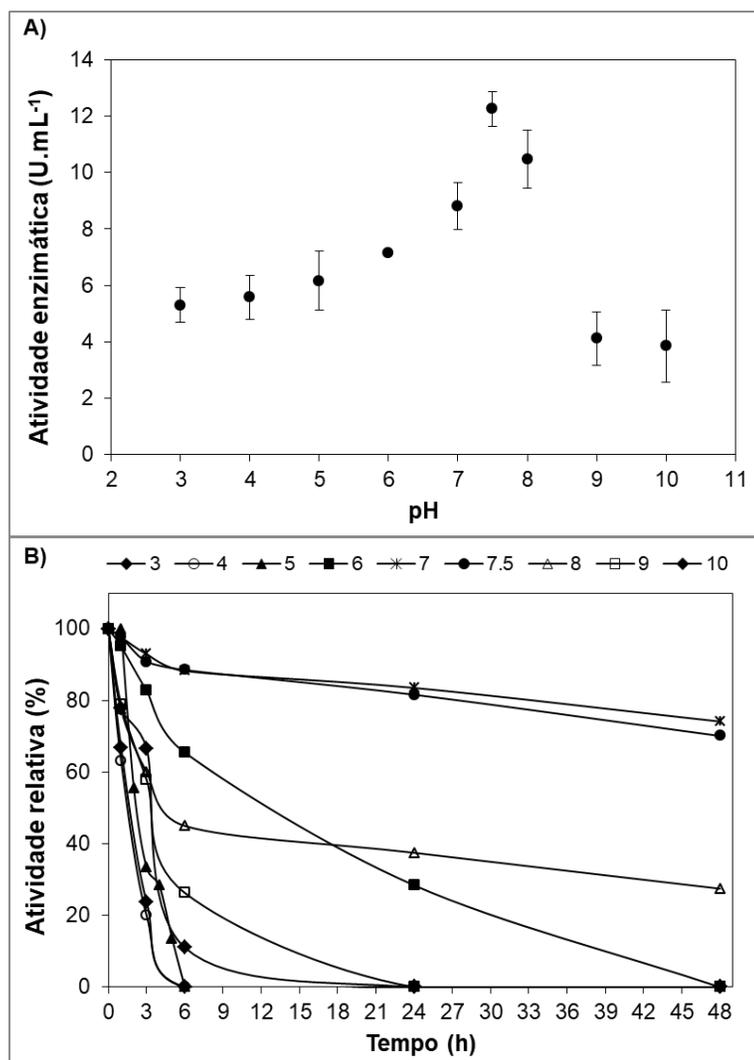


Figura 5. Caracterização da lipase produzida por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 à 37°C em relação ao pH ótimo (A) e estabilidade ao pH (B) após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95% para as medidas, embora não possam ser observadas no gráfico B, devido aos desvios pequenos entre as médias. Na estabilidade ao pH, 100% se refere à atividade relativa no tempo zero de cada pH.

A enzima produzida pela cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 obteve atividade ótima nos valores de pH de 7,5 e 8 (ANOVA *one way*, $p=0,0570$) a 37°C e permaneceu estável nos valores de pH 7 e 7,5 por 48 h, mantendo

74,13 e 70,12% da atividade inicial, respectivamente. A exposição enzimática em pH ácido ou alcalino diminuiu significativamente a atividade enzimática e uma perda de atividade hidrolítica de 100% foi obtida após 24 horas de incubação nas condições extremas (valores de pH 3, 4, 5, 9 e 10). A influência do pH na atividade da enzima deve-se à presença dos grupos ionizáveis presentes ao redor do sítio ativo, mantendo o substrato ligado à enzima e, conseqüentemente, a eficácia da catálise é otimizada (44). Na literatura, várias enzimas lipolíticas produzidas pela cepa *Aspergillus* exibiram pH ótimo entre 5 e 6 (45–47).

Os resultados de temperatura ótima e estabilidade à temperatura da lipase após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação em pH 7,5 na faixa de temperaturas de 20 a 60°C, são apresentados na Figura 6 (A e B), respectivamente.

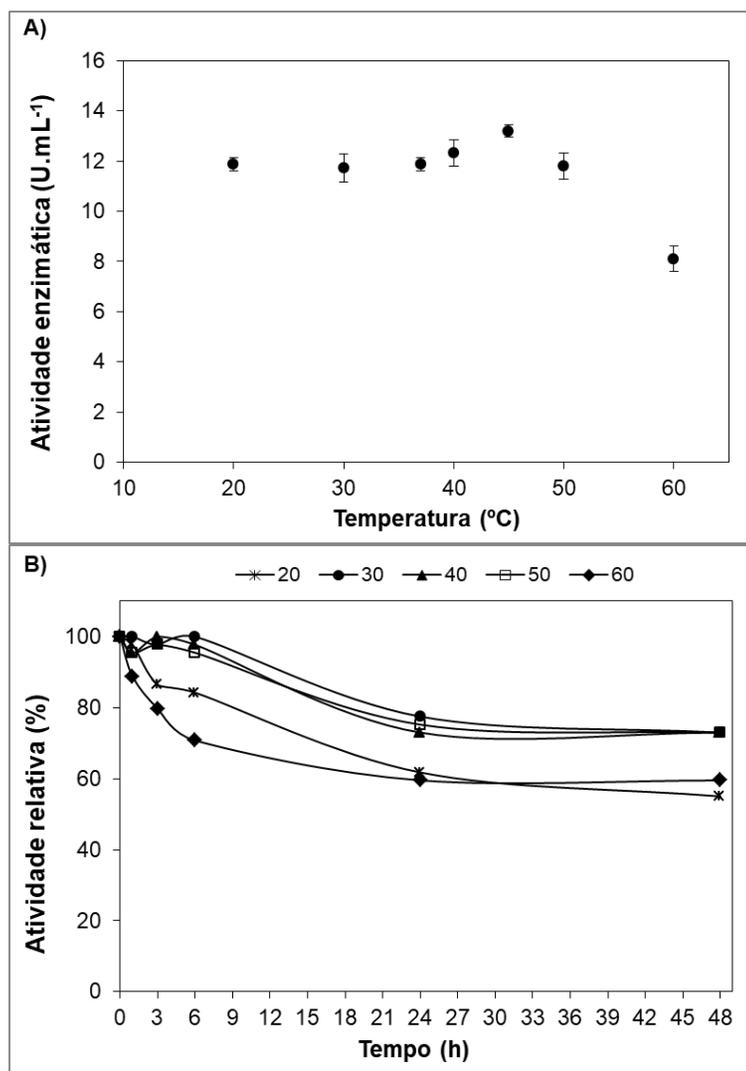


Figura 6. Caracterização da enzima lipase produzida por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 no pH 7,5: temperatura ótima (A) e estabilidade a temperatura (B) após 0, 1, 3, 6, 24 e 48 h de incubação. As barras de erro representam um intervalo de confiança de 95% para as medidas, embora não possam ser observadas no gráfico B, devido aos desvios pequenos entre as médias. Nos resultados de estabilidade de temperatura, 100% refere-se à atividade enzimática no tempo zero para cada temperatura.

Considerando a temperatura ótima, a enzima apresentou uma faixa de temperatura de atividade máxima, uma vez que não houve diferença estatística entre as atividades alcançadas nas temperaturas entre 20 e 50°C após teste

estatístico ANOVA *one way* ($p=0,1335$) com pós teste de Tukey. Tendo em vista que as atividades foram iguais estatisticamente, foi considerada 45°C como a temperatura ótima para seguimento dos ensaios. A temperatura influencia na taxa de reação enzimática: em baixas temperaturas, provavelmente a energia cinética no sistema é menor não favorecendo a formação do complexo enzima-substrato. Por outro lado, em altas temperaturas a taxa de reação aumenta, como consequência do número de colisões produtivas ($E \rightarrow S$) por unidade de tempo, mas com um aumento de temperatura e tempo de exposição, pode haver uma diminuição na taxa de formação ou desnaturação do produto causada pela perda da estrutura terciária da enzima, necessária para a ocorrência de reações catalíticas (48).

Nos ensaios de estabilidade a temperatura ao longo do tempo, à 60°C a atividade da lipase foi consideravelmente reduzida, tendo 67% da atividade média obtidas nas demais temperaturas. Embora à 20°C a atividade tenha sido próxima às condições ótimas, nos estudos de estabilidade o comportamento da lipase foi semelhante ao incubar a enzima a 20 ou a 60°C. Nestas condições, a perda de atividade foi em torno de 40% após 48 horas de incubação, enquanto nas demais, em torno de 25%. Dependendo do tempo de incubação o comportamento da enzima foi diferente, a enzima manteve uma média de 98,49% da atividade inicial nas temperaturas de 30, 40 e 50°C por 6 horas, seguindo o mesmo perfil e terminando com 73,03% de atividade ao final do período de 48 horas de teste.

Alguns estudos com lipases produzidas por diferentes gêneros de *Aspergillus* mostraram que a faixa de temperatura em que a lipase é mais estável gira em torno de 37°C: *A. flavus* (37°C (10)), *A. niger* (35°C (10)), *A. tamarii* JGIF06 (37°C (49)), resultados similares aos obtidos com a lipase produzida pela cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727. As condições ótimas de pH e temperatura alcançadas pela lipase produzida pela cepa DPUA 1727 utilizando OSU como fonte de carbono são bastante semelhantes aos resultados da lipase de *A. niger* F044, que apresentou pH e temperatura ótimos de 7,0 e 45°C, respectivamente. Neste trabalho, os autores demonstraram que a atividade lipolítica diminuiu rapidamente a uma temperatura acima de 65°C (50). Como no presente trabalho, uma faixa restrita de temperatura (20-60°C) pode ser testada, e nenhuma outra evidência sobre a desnaturação pode ser avaliada.

Após a caracterização da lipase, uma etapa de pré-purificação usando precipitação foi realizada a fim de remover alguns contaminantes e realizar a eletroforese SDS-page para determinar o peso molecular da enzima.

3.4. Testes de purificação empregando precipitação

O processo de *downstream* pode ser composto por uma série de etapas como, por exemplo, ultrafiltração, precipitação, extração líquido-líquido, técnicas cromatográficas e, dependendo da aplicação da biomolécula, é realizada uma etapa final de polimento como liofilização e/ou cristalização (51). Entre essas

técnicas, a precipitação é uma das operações unitárias mais utilizadas para recuperação de proteínas e na maior parte dos protocolos de purificação de proteínas publicados incluem pelo menos uma etapa desta técnica (3,52,53). Desta forma, no presente trabalho, esta metodologia foi avaliada. Estudou-se a precipitação de lipases com sulfato de amônia, acetona e etanol (ambos os solventes com vários ciclos) e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da atividade enzimática (U.mL⁻¹), proteínas totais (U.mg⁻¹) e o fator de purificação de cada método de purificação de lipase testado.

	Relação dos solventes orgânicos (v)	Atividade enzimática (U.mL ⁻¹)	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	Fator de purificação
Meio fermentado	n/a	30,36 ± 1,28	8,25 ± 0,35	n/a
Precipitação com sulfato de amônia e diálise	n/a	6,48 ± 0,66	30,86 ± 0,66	3,74 ± 0,38
Precipitação com acetona	1x	22,46 ± 1,46 ^c	48,83 ± 3,16 ^c	5,92 ± 0,39 ^c
	2x	21,76 ± 0,79 ^c	83,69 ± 3,05 ^{A,b}	10,14 ± 0,37 ^{A,b}
	3x	40,87 ± 0,57 ^{A,b}	86,96 ± 1,22 ^{A,b}	10,54 ± 0,15 ^{A,b}
	4x	70,50 ± 1,79 ^a	138,24 ± 3,52 ^a	16,76 ± 0,43 ^a
Precipitação com etanol	1x	35,26 ± 2,98 ^{B,b,c,d}	37,51 ± 3,17 ^d	4,55 ± 0,38 ^d
	2x	33,37 ± 2,15 ^d	71,00 ± 4,57 ^b	8,61 ± 0,55 ^b
	3x	39,80 ± 1,06 ^{A,a,c}	88,44 ± 2,36 ^{A,a}	10,72 ± 0,29 ^{A,a}
	4x	39,10 ± 0,44 ^{A,B,a,b}	59,24 ± 0,66 ^c	7,18 ± 0,08 ^c

Teste estatístico ANOVA one-way (com correção de Welch para variâncias desiguais) e pós-teste de Tukey. Os resultados são apresentados por médias e desvios padrão das triplicatas. Letras iguais representam valores iguais a um nível de significância de 5%. n/a: não se aplica. Letras maiúsculas representam igualdade entre os grupos e letras minúsculas representam igualdade intra grupos.

Primeiro, a precipitação da lipase foi realizada empregando-se sulfato de amônia, seguida por uma etapa de diálise para remover os sais inorgânicos e outros compostos com baixo peso molecular. No entanto, como pode ser observado na Tabela 3, uma redução considerável na atividade da lipase (próximo a 80%) foi alcançada após o processo de diálise. Uma razão para esses resultados pode ser a formação de agregados durante o processo de precipitação devido à desidratação da lipase (afinidade da água com sulfato de amônia), deixando os sítios ativos da lipase, que são hidrofóbicos, expostos e interagindo entre si, formando agregados que precipitam com os outros contaminantes. Sabe-se que a precipitação com sulfato de amônia é muito utilizada nos níveis laboratoriais e industriais para extrair enzimas, porém, a significativa perda de atividade (> 50%) no presente trabalho, com a lipase estudada, fez-se necessário que o estudo com outros agentes precipitantes fosse avaliado, nomeadamente, etanol e acetona. O principal efeito do solvente orgânico é a redução da atividade da água. Uma diminuição na constante dielétrica, com a adição de um solvente orgânico, leva à redução do poder de solvatação da água para uma molécula proteica hidrofílica carregada, e assim a solubilidade da proteína diminui e a precipitação ocorre (54). É importante ressaltar que as lipases de diferentes fontes microbianas podem diferir em sua estrutura e os resultados obtidos no presente trabalho são específicos da lipase da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727. Assim, em termos de aplicação industrial, as lipases de diferentes fontes microbianas devem ser caracterizadas antes de sua aplicação.

Nos experimentos com solventes orgânicos, o fenômeno de agregação não foi observado. Nos experimentos com etanol, após o primeiro ciclo, a atividade da lipase aumentou e se manteve durante os demais ciclos atingindo-se um fator de purificação de 10,72 após 3 vezes o volume de solvente para precipitação. A aplicação de mais ciclos não promoveu incremento no fator de purificação. No entanto, com a acetona, um maior número de ciclos aumentou a atividade enzimática e o fator de purificação. Após adição de 4 vezes o volume de acetona, uma atividade enzimática de $70,50 \text{ U.mL}^{-1}$ foi alcançada. Dependendo da aplicação da lipase, ambos os solventes orgânicos podem ser usados. Os resultados com o etanol são bastante interessantes, pois, além do etanol ser um bom agente precipitante das lipases, é um solvente frequentemente utilizado no processo em que a lipase é aplicada, como a produção de biodiesel. Assim, se o etanol é usado como agente precipitante das lipases, seu excesso não precisa ser removido antes de sua aplicação.

A eletroforese SDS-page foi realizada com a lipase precipitada com etanol 3 vezes (Figura 7).

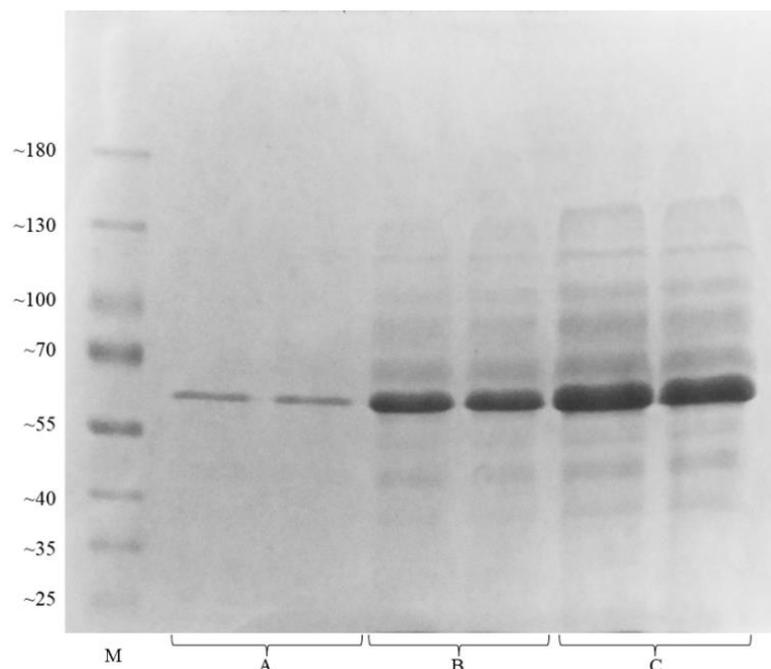


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da lipase precipitada em etanol: M) marcador de peso molecular (10 kDa), A) meio fermentado; B) 90 mL de meio fermentado precipitado e ressuspendido em 5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 7,5; e C) 90 mL de meio fermentado precipitado e ressuspendido em 2,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 7,5.

O caldo fermentado contém uma banda majoritária (~ 64 kDa) e outras bandas com menores concentrações. Após a técnica de precipitação, o precipitado ressuspendido apresentou múltiplas bandas provando que a precipitação é um método que não promove alta purificação mas sim a concentração da enzimas nas frações precipitadas, podendo ser observadas nas bandas mais alargadas da eletroforese (colunas B e C). Dependendo da fonte microbiana da lipase, o peso molecular da lipase pode ser de 20 a 75 kDa (55) e estudos de purificação devem ser realizados para provar qual das bandas obtidas refere-se a lipase de interesse.

4. Conclusões

Neste trabalho, a nova cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 foi estudada para produção de lipases, usando óleo de resíduo agroindustrial como indutor. Foi observado que o resíduo agroindustrial pode ser utilizado para este propósito, principalmente, se apresentar alta composição de ácidos graxos (>80%). Neste sentido, o óleo de semente de uva mostrou ser uma alternativa como indutor na produção de lipases por, sendo este um resíduo industrial com características desejadas. A enzima produzida apresentou um pH ótimo de 7,5 e estabilidade entre 7 e 7,5, temperatura ótima na faixa de 20 à 50°C e estabilidade térmica entre 30 e 50°C ao final de 48 horas, com 72,13% da atividade relativa ao tempo inicial do teste. Finalmente, a integração de novas cepas com resíduos agroindustriais adequados pode emergir como um aspecto importante para melhorar o bioprocessamento das lipases, uma vez que essas enzimas apresentam uma ampla gama de aplicações.

Referências

1. Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol.* 2013;16(3):1–38.
2. Palomo JM, Segura RL, Fernández-Lorente G, Pernas M, Rúa ML,

- Guisán JM, et al. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog.* 2004;20(2):630–5.
3. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv.* 2001;19(8):627–62.
 4. Lai O-M, Lee Y-Y, Phuah E-T, Akoh CC. Lipase/esterase: properties and industrial applications [Internet]. Reference Module in Food Science. Elsevier; 2018;1-11 .
 5. Messias JM, Costa BZ da, Lima VMG de, Giese C, Dekker RFH, Barbosa A de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semin Ciências Exatas e Tecnológicas* [Internet]. 2011;32(2):213–34.
 6. Dewan SS. Global markets for enzymes in industrial applications - BIO030H [Internet]. BCC Research. 2014 [cited 2018 Jun 30]. p. 1–157.
 7. Contesini FJ, Lopes DB, MacEdo GA, Nascimento MDG, Carvalho PDO. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J Mol Catal B Enzym.* 2010;67(3–4):163–71.
 8. Padilha GS, Ferreira JF, Castiglioni GL, Alegre RM, Tambourgi EB. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciência e Tecnol Aliment* [Internet]. 2011;31(1):16–22.
 9. Domínguez A, Costas M, Longo MA, Sanromán A. A novel application

- of solid state culture: Production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol Lett. 2003;25(15):1225–9.
10. Colla LM, Ficanha AMM, Rizzardi J, Bertolin TE, Reinehr CO, Costa JAV. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. Biomed Res Int. 2015;2015:1–9.
 11. Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchell DA, Ramos LP, Fontana JD. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. Food Technol Biotechnol. 2003;41(2):105–10.
 12. Jia J, Yang X, Wu Z, Zhang Q, Lin Z, Guo H, et al. Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. Biomed Res Int. 2015;2015:1–8.
 13. Sethi BK, Nanda PK, Sahoo S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. Brazilian J Microbiol. 2016;47(1):143–9.
 14. Sadh PK, Duhan S, Duhan JS. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour Bioprocess [Internet]. 2018;5(1):1.
 15. Shinagawa FB, Santana FC De, Rabelo L, Torres O, Mancini-filho J. Grape seed oil: a potential functional food? Food Sci Technol [Internet]. 2015;35(3):399–406.
 16. Panagiotopoulos IA, Pasiadis S, Bakker RR, de Vrije T, Papayannakos

- N, Claassen PAM, et al. Biodiesel and biohydrogen production from cotton-seed cake in a biorefinery concept. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013;136:78–86.
17. Lakshmi BS, Kanguane P, Abraham B, Pennathur G. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). *Lett Appl Microbiol*. 1999;29(1):66–70.
 18. Agostini F, Bertussi RA, Agostini G, Atti Dos Santos AC, Rossato M, Vanderlinde R. Supercritical extraction from vinification residues: Fatty acids, α -tocopherol, and phenolic compounds in the oil seeds from different varieties of grape. *Sci World J*. 2012;2012.
 19. Carbonell-Verdu A, Bernardi L, Garcia-Garcia D, Sanchez-Nacher L, Balart R. Development of environmentally friendly composite matrices from epoxidized cottonseed oil. *Eur Polym J*. 2015;63:1–10.
 20. Hong SB, Cho HS, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Novel *Neosartorya* species isolated from soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(2):477–86.
 21. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403–10.
 22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33(7):1870–4.
 23. Bharti MK, Khokhar D, Pandey AK, Gaur AK. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus japonicas*: A potent enzyme for biodiesel production. *Natl Acad Sci Lett*. 2013;36(2):151–6.

24. Yadav SK, Bisht D, Tiwari S, Darmwal NS. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2015;4(4):667–77.
25. Mayordomo I, Randez-Gil F, Prieto JA. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem.* 2000;48(1):105–9.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
28. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 2012;109(16):6241–6.
29. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *J Nat Prod.* 2017;80(3):756–70.
30. Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *nigri*. *Stud Mycol.* 2004;50:45–61.
31. Silva DM, Batista LR, Rezende EF, Fungaro MHP, Sartori D, Alves E. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian J Microbiol.* 2011;42(2):761–73.

32. Gupta P, Gupta N, Rai V, Parkhey P. Study of effect of nutritional factors for optimization of lipase production by lipolytic fungi. 2015;5(3):273–84.
33. Dobrev G, Zhekova B, Dobрева V, Strinska H, Doykina P, Krastanov A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. Biocatal Agric Biotechnol. 2015;4(1):77–82.
34. Orsavova J, Misurcova L, Vavra Ambrozova J, Vicha R, Mlcek J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. Int J Mol Sci. 2015;16(6):12871–90.
35. Ghosh P, Saxena R, Gupta R, Yadav R, Davidson S. Microbial lipases - properties and applications. J Microbiol Biotechnol Food Sci [Internet]. 2016;6(2):799–807.
36. Saravanan AN, Suchitra N, Dhandayuthapani K. Role of saturated fatty acids in lipase production – using *Pseudomonas aeruginosa*. J Food Biochem. 2007;31(2007):748–56.
37. Tong X, Busk PK, Lange L. Characterization of a new sn-1,3-regioselective triacylglycerol lipase from *Malbranchea cinnamomea*. Biotechnol Appl Biochem. 2016;63(4):471–8.
38. Andrade GSS, Carvalho AKF, Romero CM, Oliveira PC, De Castro HF. *Mucor circinelloides* whole-cells as a biocatalyst for the production of ethyl esters based on babassu oil. Bioprocess Biosyst Eng. 2014;37(12):2539–48.

39. Coradi GV, Da Visitação VL, De Lima EA, Saito LYT, Palmieri DA, Takita MA, et al. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Ann Microbiol.* 2013;63(2):533–40.
40. Hosseinpour MN, Najafpour GD, Younesi H, Khorrami M. Submerged culture studies for lipase production by *Aspergillus niger* NCIM on soya flour. *Middle-East J Sci Res.* 2011;7(3):362–6.
41. Coelho JP, Filipe RM, Robalo MP, Stateva RP. Recovering value from organic waste materials: Supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds. *J Supercrit Fluids.* 2018;
42. Dalmau E, Montesinos JL, Lotti M, Casas C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb Technol.* 2000;26(9–10):657–63.
43. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed. Book. 2013.
44. Marzzoco A, Torres BB. *Bioquímica Básica*. 3^a. Koogan G, editor. Rio de Janeiro; 2007.
45. Liu G, Hu S, Li L, Hou Y. Purification and characterization of a lipase with high thermostability and polar organic solvent-tolerance from *Aspergillus niger* AN0512. *Lipids.* 2015;50(11):1155–63.
46. Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale D V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresour Technol.* 2009;100(3):1486–90.
47. Namboodiri VM, Chattopadhyaya R. Purification and biochemical

- characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*. 2000;35(5):495–502.
48. Gomes FM, De Paula A V., Silva GDS, De Castro HF. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Quim Nova*. 2006;29(4):710–8.
 49. Das A, Shivakumar S, Bhattacharya S, Shakya S, Swathi SS. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamaris* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. *3 Biotech*. 2016;6(2):131.
 50. Shu ZY, Yang JK, Yan YJ. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. *Chin J Biotechnol*. 2007;23(1):96–101.
 51. Santos NV, Santos-Ebinuma VC, Pessoa Junior A, Pereira JFB. Liquid-liquid extraction of biopharmaceuticals from fermented broth: trends and future prospects. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2018;93(7):1845–63.
 52. Ventura SPM, Coutinho JAP. Lipase production and purification from fermentation broth using ionic liquids. *Ion Liq Lipid Process Anal Oppor Challenges* [Internet]. 2016;59–97.
 53. Souza RL, Lima RA, Coutinho JAP, Soares CMF, Lima ÁS. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2014;155:118–26.
 54. Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Isolation and purification of proteins

[Internet]. Enzymes in Industry - Production and Applications. New York: Marcel Dekker, Inc; 2007. 1-585.

55. De Castro HF, Mendes AA, Dos Santos JC, De Aguiar CL. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Quim Nova*. 2004;27(1):146–56.

Capítulo 2.

Imobilização da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 em suporte hidrofóbico visando aplicações em sínteses orgânicas.

Imobilização da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 em suporte hidrofóbico visando aplicações em sínteses orgânicas.

Mariana Vendrasco Tacin^{a,b}

Ana Lucia Martiniano Nasser^a

Jose Miguel Palomo^b

Ariela Veloso de Paula^a

Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma^a

^a Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo.

^b Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica (ICP-CSIC), Cantoblanco, Madrid, Espanha.

Resumo

As lipases são enzimas que, por apresentarem alta especificidade e seletividade em substratos variados, podem ser amplamente empregadas em reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, alcoólise e acidólise. A aplicabilidade destas enzimas pode ser ampliada se as mesmas estiverem na forma imobilizada pois este processo pode aumentar a estabilidade da enzima em relação à temperatura e pH, e possibilitar a reutilização do biocatalisador, diminuindo os custos da produção. O objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase produzida por cultivo submerso de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 e avaliar sua aplicabilidade na síntese de ésteres. Inicialmente, testou a afinidade das enzimas por diferentes substratos (*p*-nitrofenil propionato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato e *p*-nitrofenil palmitato) e a enzima apresentou maior atividade na presença de *p*-nitrofenil propionato, mostrando alta especificidade por ésteres de cadeia curta. Posteriormente, iniciou-se os estudos de imobilização por interação hidrofóbica e o óleo residual do processo fermentativo interferiu na imobilização pois o óleo se ligava ao suporte ao invés da enzima. Assim, avaliou-se o cultivo submerso com diferentes concentrações de óleo (2, 4, 6 e 8 mL.L⁻¹) e carga de inóculo (10 e 20 discos de micélio), seguido de extração do óleo residual em 4 ciclos com n-hexano. Após esse processo, foi possível imobilizar a lipase em suporte hidrofóbico. Os ensaios de imobilização em suportes octil-sepharose (C₈) e octadecil-sepabeads (C₁₈) mostraram que a enzima de interesse foi isolada e concentrada em octil-sepharose por 1 hora, tendo 22% da atividade em relação à solução inicial do meio fermentado. Para aumentar a quantidade de enzimas adsorvidas no suporte, foram feitos 4 ciclos de imobilização seguidos, no mesmo suporte, tendo um rendimento final de imobilização de 151,32% e aumento da atividade específica de 136%. A enzima imobilizada apresentou características diferentes da enzima livre em relação ao pH e temperatura, sendo mais estável em valores de pH ácido e temperatura de 50 e 60°C. O teste de reuso do derivado mostrou uma boa capacidade de reaproveitamento, uma vez que, após 5 ciclos, a enzima manteve 75% da atividade inicial até o final dos testes (20 ciclos). Esse resultado mostrou que a realização da imobilização por adsorção em suporte hidrofóbico pode purificar a enzima e manter sua estabilidade para uso por diversos ciclos. Embora existam vários estudos na literatura sobre aplicações de enzimas na síntese de ésteres de bioaromas, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que é necessário avaliar a escolha do álcool e do ácido a serem utilizados na síntese devido à especificidade da lipase por substratos de cadeia curta, média ou longa.

Palavras-chaves: lipases; imobilização por adsorção; suporte hidrofóbico; síntese de ésteres.

1. Introdução

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são enzimas que podem ser obtidas de fontes animal, vegetal ou microbiana (1), porém a sua produção por fungos representa um grande número de pesquisas na literatura (2–8). Os fungos, especialmente, os filamentosos são capazes de produzir estas enzimas de maneira mais intensa e diversificada comparado as outras fontes ao se considerar as propriedades enzimáticas e a especificidade pelo substrato, características essenciais para seu processo de aplicação industrial (9,10). Em adição, as lipases produzidas por espécies de *Aspergillus* são classificadas com GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”), pela agência regulatória norte americana FDA (“*Food and Drug Administration*”), sendo seguro sua utilização em bioprodutos destinados a consumo humano (11).

Levando em consideração sua aplicação, as lipases podem participar de reações de bioconversão, como hidrólise, esterificação, transesterificação, acidólise e alcoólise (12), mas sua função básica é catalisar reações na interface óleo-água, dando origem a partir do triacilglicerol às moléculas de diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos quando é sn-1,3 regioseletiva, e glicerol e ácidos graxos livres quando a enzima não é regioseletiva (1). As lipases têm a capacidade de hidrolisar tanto triglicerídeos solúveis em água quanto insolúveis, o que expande o seu range de aplicação (13).

Um dos maiores problemas na aplicação de enzimas é em relação a sua estabilidade frente as condições do processo. Assim, a técnica de

imobilização de enzimas em diversos suportes vem sendo amplamente estudada com o intuito de promover a melhora de sua estabilidade em relação a diferentes parâmetros, dentre eles, ao pH e temperatura (14–16). Além disso, a enzima imobilizada pode ser reutilizada reduzindo o custo com biocatalisadores e, conseqüentemente, de produção e do produto final (17).

A ligação da enzima ao suporte pode ocorrer de várias maneiras, por exemplo, por ligação covalente (18–21), interação hidrofóbica (22,23), encapsulação (24–26) e *cross-linking* (27,28).

As lipases têm a característica única de ter uma cadeia polipeptídica que forma uma estrutura denominada “*tampa*” que cobre o seu sítio ativo em ambiente hidrofílico, e na presença de substrato hidrofóbico sua conformação muda, expondo o sítio ativo (22,29). Desta maneira, a depender do tipo da imobilização empregada, esta também é uma estratégia que favorece a manutenção da forma aberta da enzima, facilitando a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima (30). A imobilização por interação hidrofóbica é considerada um processo simples e pode ocorrer com baixa força iônica, além de poder ser empregada para purificar e imobilizar a enzima em uma única etapa (29).

Como citado anteriormente, o uso de lipases em processos industriais é muito amplo sendo esta enzima empregada na produção de detergentes, fármacos, biodiesel, na indústria têxtil e alimentícia (8), por exemplo. Nas indústrias de alimentos, bebidas, cosmética e farmacêutica, a lipase pode ser usada na produção de compostos aromáticos similares aos naturais, como por exemplo, o propionato de isoamila, que é um composto de alto

valor agregado usado em alimentos pois é o responsável pelo aroma de abacaxi e damasco (31). Considerando que há uma preocupação atual na produção de compostos sem a utilização de compostos químicos ou que gerem resíduos que possam contribuir com a poluição do ambiente, a utilização de enzimas em bioprocessos parece ser uma alternativa segura e eficiente.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi imobilizar a lipase produzida a partir da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727 por cultivo submerso, em suporte hidrofóbico octil-sepharose, caracterizar a enzima livre liofilizada e imobilizada em relação ao pH e temperatura, e avaliar sua capacidade de reutilização após a imobilização. A partir desses parâmetros, foi realizado um estudo de aplicação da enzima imobilizada visando a síntese do éster de propionato de isoamila.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Como suporte de imobilização, empregou-se o octil-sepharose® 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences). Os substratos *p-nitrofenil butirato*, *p-nitrofenil decanoato* e *p-nitrofenil palmitato* foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O substrato *p-nitrofenil propionato* foi sintetizado em nosso laboratório (Anexo 1). Para tanto, foram adquiridos *p-nitrofenol*, piridina, cloreto de propionila 98% e diclorometano 99,8% da Sigma-Aldrich®. O

padrão de propionato de isoamila foi gentilmente cedido por Capuani (São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Obtenção de lipase por fermentação

A lipase foi produzida por cultivo submerso da cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727, proveniente da Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. A composição do meio fermentado foi: 20,0 g.L⁻¹ de peptona bacteriológica, 0,6 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1,0 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1,0 g.L⁻¹ de NH₄NO₃ e 8,0 mL.L⁻¹ de óleo de semente de uva. A fermentação foi realizada em frascos tipo Erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 mL do meio fermentado e inóculo de 20 discos de micélio. Após a fermentação por 96 horas, à 30°C e 150 rpm em shaker orbital, os meios foram filtrados com auxílio de funil de Buchner de porcelana em filtro de papel 80 g.m⁻² (Whatman, UK). O filtrado livre de células foi liofilizado em liofilizador (Thermo Scientific® ModulyoD) para ensaios com a enzima livre liofilizada e para imobilização.

2.3. Estudos da produção de lipase variando a concentração do óleo de semente de uva e tamanho do inóculo de Aspergillus sp. DPUA 1727

A fim de incrementar a produção de lipases pela fermentação de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 utilizando óleo de semente de uva, testes variando a concentração do óleo de semente de uva e da carga de inóculo

do fungo na fermentação foram realizados, seguindo o esquema apresentado na figura 1. As variações foram de 10 e 20 discos de micélio e 2, 4, 6 e 8 mL.L⁻¹ de óleo de semente de uva no meio fermentado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

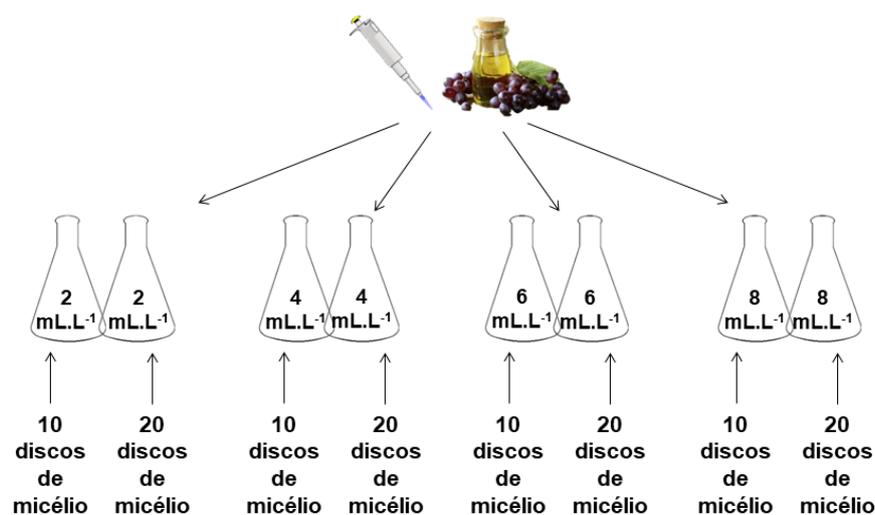


Figura 1. Esquema de variação de inóculo de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 e adição de óleo de semente de uva nos meios fermentados.

A fermentação foi realizada nas condições descritas anteriormente. Os meios foram filtrados após 96 horas e a atividade enzimática foi quantificada em 2 condições: 1) do meio fermentado após filtração, e 2) do meio fermentado liofilizado e submetido a extração do óleo residual com n-hexano, de cada condição, como descrito na seção 2.4.

2.4. Extração do óleo residual da fermentação

O óleo de semente de uva que não foi consumido pelo microrganismo durante o cultivo submerso foi extraído empregando 4 ciclos com *n*-hexano. Assim, 0,5 g de meio fermentado liofilizado foi ressuspensionado em 5 mL de tampão acetato 5 mM (pH 5) e adicionou-se 5 mL de *n*-hexano. O sistema permaneceu sob agitação em homogeneizador horizontal durante 30 min. Posteriormente, a fase aquosa contendo a enzima foi retirada e a fase do *n*-hexano foi descartada juntamente com o óleo extraído. À fase aquosa separada adicionou-se mais 5 mL de *n*-hexano, e esse processo de extração foi feito por mais 3 ciclos. Após os 4 ciclos de extração com *n*-hexano, a fase aquosa foi utilizada na imobilização. A figura 2 mostra um esquema representativo do processo de extração do óleo residual da fermentação, com *n*-hexano.

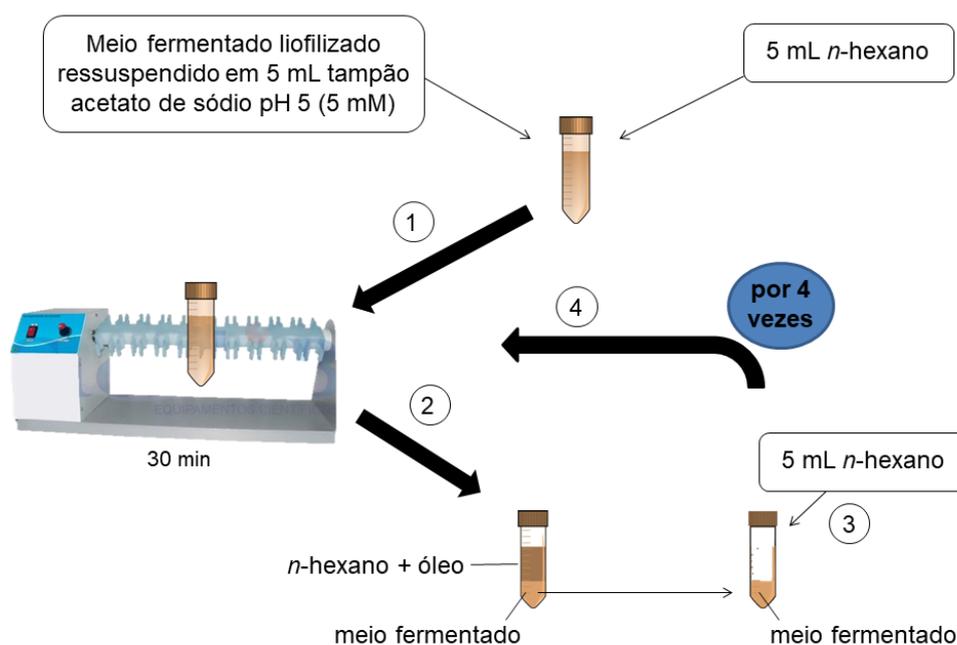


Figura 2. Esquema representativo do processo de extração, com *n*-hexano, do óleo não utilizado na síntese de lipase na fermentação.

2.5. Avaliação da imobilização em diferentes suportes hidrofóbicos

Para o processo de imobilização da enzima com o objetivo de promover a purificação do meio fermentado, foram feitos dois testes utilizando 0,5 g do suporte a ser testado e 3 mL de solução com o meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão fosfato 25mM pH 7,5: 1) imobilização em octadecil-sepabeads por 30 minutos seguido de octil-sepharose por 2 horas; e 2) imobilização em octil-sepharose por 1 hora seguido de octadecil-sepabeads por 1 hora e meia. A representação dos testes de imobilização é mostrada na figura 3.

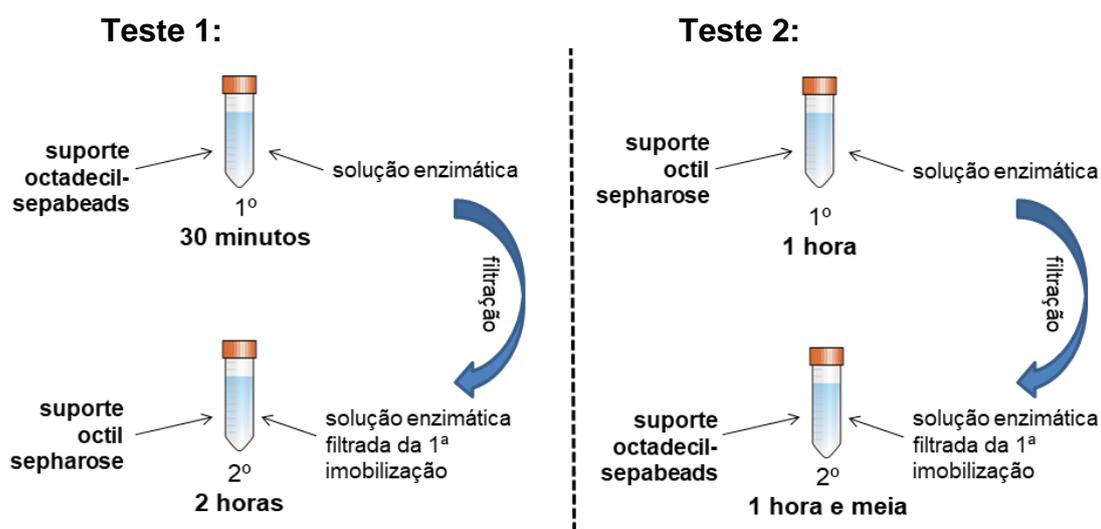


Figura 3. Esquema dos testes de imobilização da lipase utilizando suportes de diferentes hidrofobicidades: 1) Imobilização em suporte octadecil seguido de suporte octil, e 2) imobilização em suporte octil seguido de suporte octadecil.

2.6. Imobilização em cascata da lipase em suporte octil-sepharose

A imobilização da lipase foi feita pela adição de 3 mL de solução enzimática após extração do óleo residual com n-hexano (seção 2.4) a 1 g

de suporte octil-sepharose. A mistura foi colocada em seringa com filtro acoplado e mantida em homogeneizador horizontal sob agitação suave durante 1 hora e meia. O derivado (enzimas adsorvidas no suporte) foi filtrado da solução, ficando retido na seringa pelo filtro, e submetido a mais 4 ciclos de imobilização com adição de novos 3 mL da solução de enzima a cada etapa. A figura 4 apresenta um esquema do processo de imobilização.

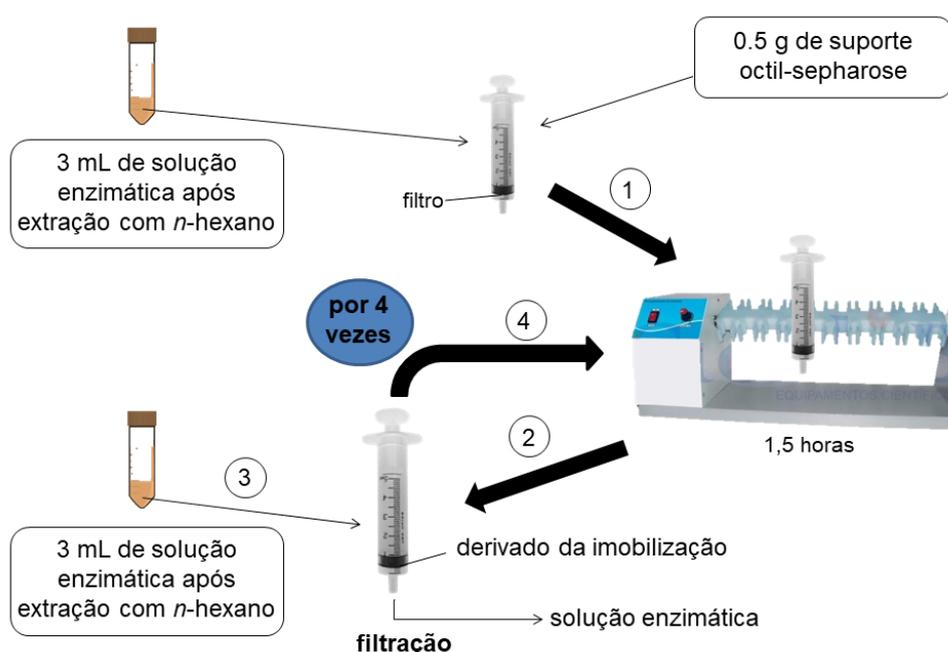


Figura 4. Esquema representando cada etapa do processo de imobilização da solução enzimática após processo de extração com *n*-hexano.

O rendimento da imobilização (RI %) foi calculado a partir da Eq. 1:

$$RI = \frac{A_i - A_f}{A_i} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

Onde A_i é a atividade inicial e A_f é a atividade do sobrenadante após imobilização.

2.7. Avaliação da influência do pH e da temperatura na atividade da enzima imobilizada

A influência do pH e da temperatura na atividade da lipase imobilizada em octil-sepharose e da enzima livre em meio fermentado liofilizado foram avaliadas a partir da solubilização de ambos na concentração de $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$, de acordo com a condição a ser testada. Para o teste de pH ótimo, o derivado foi solubilizado nas seguintes soluções tampão (5 mM): glicina-HCl pH 3, acetato de sódio pH 4 e 5, e fosfato pH 6, 7 e 8. A atividade foi determinada a 25°C . A temperatura ótima foi determinada a partir da dosagem de atividade em 30 à 70°C , utilizando solução tampão acetato 5 mM pH 5 e tampão fosfato 5 mM pH 7, para enzima imobilizada e livre (meio fermentado liofilizado), respectivamente.

Nos ensaios de estabilidade em relação ao pH o derivado foi incubado à 25°C após ser suspenso nas soluções tampão citadas no ensaio de pH ótimo. Para verificar a estabilidade em diferentes temperaturas, os testes foram realizados na faixa de temperatura de 30 a 70°C , com o derivado e a enzima livre liofilizada suspensos em tampão acetato 5 mM pH 5. Em todos os ensaios, alíquotas de $150 \mu\text{L}$ foram retiradas para a determinação da atividade enzimática, nos tempos de 0, 1, 3, 6, 12 e 24 h de incubação em banho seco Fisher Scientific®, com agitação à 800 rpm.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os desvios padrões calculados. A atividade relativa da lipase (% RA) foi determinada de acordo com a Eq. 2, para todos os estudos de estabilidade.

$$RA = \frac{LA}{LA_0} \times 100 \quad \text{Eq. 2}$$

Onde LA e LA_0 são as atividades da lipase ($U.g^{-1}$) após o tempo de incubação e atividade enzimática inicial, respectivamente.

2.8. Teste de reuso do derivado imobilizado na dosagem de atividade durante diferentes ciclos

Para o teste de reuso da enzima imobilizada, 11 mg.mL^{-1} de derivado (enzima + suporte) foram adicionados ao protocolo de ensaio de atividade lipase (seção 2.6.), para volume final de 2,65 mL, em uma seringa com filtro acoplado e mantidos sob agitação suave. A absorbância foi medida no tempo zero e ao final de 15 minutos de reação. O meio reacional foi filtrado da seringa para adicionar outra reação ao derivado, num total de 20 ciclos.

2.9. Síntese de propionato de isoamila empregando planejamento fatorial 2^3

O protocolo para a síntese do propionato de isoamila foi baseado no trabalho de Krishna e Karanth (32). A fim de identificar a influência de algumas variáveis na síntese do éster, três variáveis foram testadas: temperatura (40, 50 e 60°C), razão entre ácido propiônico e álcool isoamílico (1:1, 1:2 e 1:4, respectivamente) e massa de enzima imobilizada adicionada ao ensaio (125, 250 e 375 mg) de acordo com a matriz experimental apresentada na tabela 1. As reações foram realizadas em frascos tipo Erlenmeyers (50 mL) com tampa para um volume total de reação de 5 mL

contendo ácido propiônico e álcool isoamílico dissolvidos em heptano, acrescido da enzima imobilizada. A reação foi mantida por 24 h em agitador orbital (150 rpm). Após esse período foi determinada a concentração de propionato de isoamila por Cromatografia gasosa (seção 2.11.4).

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para a síntese de propionato de isoamila.

Ensaio	Temperatura (°C)	Relação ácido:álcool (v/v)	Enzima imobilizada (mg)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (125)
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (125)
3	-1 (40)	1 (1:4)	-1 (125)
4	1 (60)	1 (1:4)	-1 (125)
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (375)
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (375)
7	-1 (40)	1 (1:4)	1 (375)
8	1 (60)	1 (1:4)	1 (375)
9 - 12*	0 (50)	0 (1:2)	0 (250)

* Ponto central

2.10. Métodos analíticos

2.10.1. Atividade enzimática pela quantificação de *p*-nitrofenol (*pNP*) e avaliação da especificidade da lipase com diferentes substratos

Os ensaios foram feitos baseado no protocolo de Palomo et al. (30), onde foram adicionados ao ensaio 2,5 mL de tampão acetato de sódio 5 mM (pH 5), 25 μ L de *p*-nitrofenil propionato diluído em acetonitrila (50 mM) e 150 μ L de solução enzimática (0,1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de enzima liofilizada ou do derivado

imobilizado em tampão acetato de sódio pH 5 (5 mM)). A reação permaneceu por 15 minutos em espectrofotômetro (Fotodiodo Array UV/Vis Scinco S-3150) e a liberação de *p-nitrofenol* foi medida pela absorvância à 348 nm através da formação da coloração amarela. A atividade da lipase foi determinada a partir da equação da reta da curva padrão do *p-nitrofenol* (*pNP*) ($y = 0,0061x$, $r^2 = 0,9996$). Uma unidade internacional de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μmol de *pNPP* por minuto, nas condições acima citadas.

Para verificar a especificidade da lipase utilizando diferentes substratos, foram testados: *p-nitrofenil propionato* (C3), *p-nitrofenil butirato* (C4), *p-nitrofenil decanoato* (C10) e *p-nitrofenil palmitato* (C16). Para tanto, a reação ocorreu conforme descrito porém avaliando os substratos citados diluídos em acetonitrila. As leituras de absorvância foram feitas à 348 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Jasco v.730).

2.10.2. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi feita baseado no método de Bradford (33), utilizando o princípio de ligação proteína-corante de Coomassie Brilliant Blue G-250, com o reagente Bio-rad®, a 595 nm em espectrofotômetro (Photodiodo Array UV/Vis Scinco S-3150). A quantidade de proteínas foi definida a partir da equação da reta da curva padrão utilizando soroalbumina bovina ($y = 1,26x$), com valor de $R^2 = 0,6287$.

2.10.3. Análise SDS-PAGE

As análises de eletroforese foram feitas baseadas no método de Laemmli (34). O gel utilizado foi de poliacrilamida 10%, aplicando 20 μ L de amostra e 2 μ L de marcador de peso molecular de 10 kDa.

2.10.4. Análise do propionato de isoamila

A formação do éster propionato de isoamila foi verificada por cromatografia gasosa em cromatógrafo modelo Perkin Elmer Clarus 680 (Shelton, EUA), com coluna Supelcowax® 10 (30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m) e detector de ionização de chama. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio em um fluxo de 1,91 mL/min e a temperatura do forno foi mantida a 270°C.

3. Resultados e discussão

3.1. Atividade da enzima lipase utilizando diferentes substratos

A habilidade da enzima de converter o substrato eficientemente em produto é chamada de especificidade de substrato, que é relacionada aos tipos de aminoácidos presentes no sítio ativo e das interações eletrostáticas durante o estado de transição (35). Baseado no princípio da quantificação do *p-nitrofenol* pela formação da coloração amarela, absorvida no comprimento de onda de 348 nm, os testes foram feitos utilizando os substratos, esterres de *p-nitrofenil*: propionato (C3), butirato (C4), decanoato (C10) e palmitato

(C16). Os resultados foram expressos em atividade relativa (%) como mostrado na figura 5.

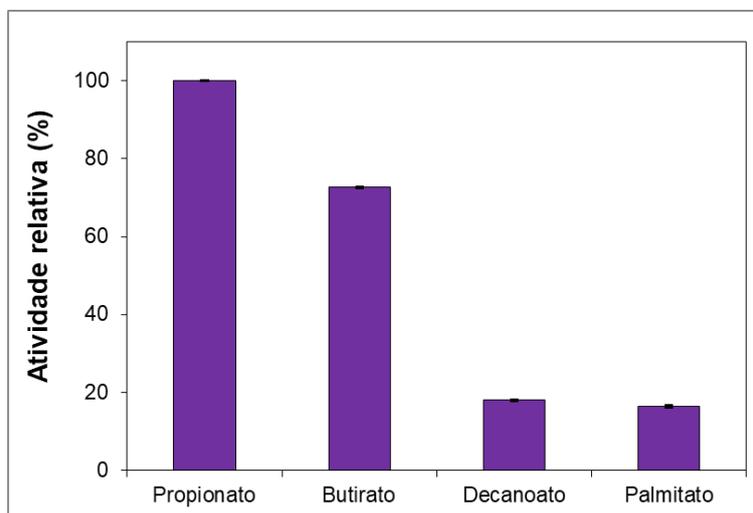


Figura 5. Atividade relativa (%) da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727, na forma livre liofilizada ($0,1 \text{ g.mL}^{-1}$ de solução tampão fosfato 25 mM pH 7,5), utilizando os substratos *p*-nitrofenil propionato, *p*-nitrofenil butirato, *p*-nitrofenil decanoato e *p*-nitrofenil palmitato. Foi considerada 100% a atividade enzimática obtida com o *p*-nitrofenil propionato ($568,61 \text{ U.g}^{-1}$). Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média.

O éster propionato apresentou a maior atividade, seguido do butirato, com 73% da atividade relativa ao propionato. Os resultados apresentados na figura 4 mostram que a lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 apresenta preferência por ésteres de cadeia curta (C3 e C4), perfil semelhante ao apresentado pelas esterases (36). Tanto as lipases quanto as esterases são enzimas que hidrolisam ligação éster, porém, as lipases exibem alta atividade em relação ao estado agregado de seu substrato, enquanto as esterases apresentam maior atividade relativa ao estado solúvel em água de seu substrato (37). De maneira geral, as lipases podem hidrolisar tanto substrato de cadeia curta e solúveis em água quanto os insolúveis. Como

neste trabalho a enzima é de origem microbiana a partir de um processo fermentativo, a especificidade da enzima pelo substrato é dependente do metabolismo do microrganismo.

Na literatura encontram-se trabalhos com resultados semelhantes ao aqui reportados, ou seja, as melhores atividades foram, também, obtidas com éster de cadeia curta. No trabalho de Esteban-Torres et al. (38), a lipase de *Lactobacillus plantarum* apresentou melhor atividade com acetato (C2) > butirato (C4) = miristato (C14) > caprilato (C8) = laurato (C12) > laurato (C12) = palmitato (C16) (38). Já no trabalho de Nalder et al. (30) a lipase B de *Candida antarctica* forneceu maior atividade com o butirato (C4) > octanoato (C8) > palmitato (C16) (36). De castro et al. (32) ao trabalhar com lipase de *Aspergillus westerdijkiae* encontrou a seguinte sequência de preferência de substrato pelo microrganismo: (C4) > palmitato (C16) > dodecanoato (C12) (39).

As lipases são enzimas que apresentam uma variabilidade em relação a estabilidade térmica, especificidade de substrato e enantiosseletividade (40). A partir dos resultados obtidos, padronizou-se o substrato *p-nitrofenil propionato* em todos os ensaios posteriores.

3.2. Estudo da concentração de óleo de uva na produção de lipases e extração do óleo residual com *n*-hexano

O incremento da produção de lipase a partir da variação do tamanho do inóculo e da concentração de óleo de semente de uva no meio

fermentado teve como objetivo adequar a quantidade de óleo metabolizado pelo microrganismo de forma a ter o mínimo de óleo ao fim do processo fermentativo. Esse estudo se deu a partir da tentativa de imobilização em suporte hidrofóbico na condição de 10 discos de micélio em 100 mL de meio fermentado, com 8 mL.L^{-1} de óleo de uva. Após uma tentativa de imobilização por 90 min, a atividade do derivado foi igual a zero. Isso possivelmente ocorreu, pois, o óleo residual da fermentação pode ter adsorvido ao suporte antes da lipase, ocupando a superfície, e, assim, impossibilitando a adsorção da enzima. O resultado das atividades dos meios fermentados (MF) e dos meios liofilizados e submetidos à extração do óleo residual com n-hexano (EH) estão apresentados na figura 6.

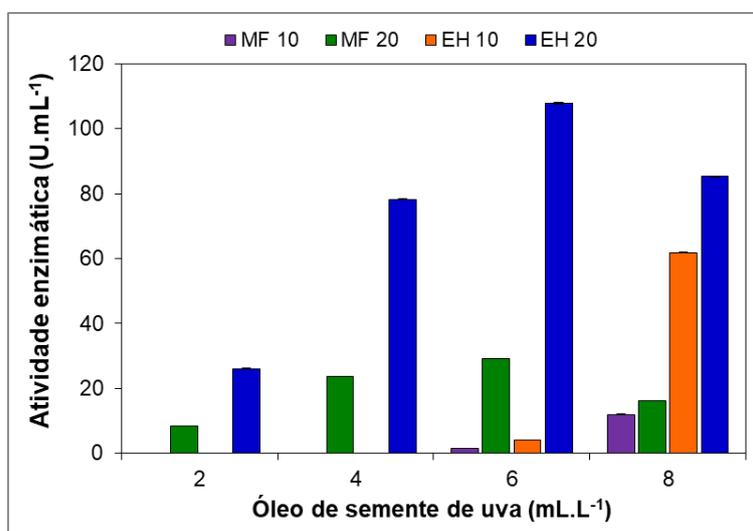


Figura 6. Atividade enzimática da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 no meio fermentado (MF), e no meio fermentado liofilizado após extração com n-hexano (EH). Enzima obtida em cultivo submerso realizado variando a concentração de óleo de semente de uva e tamanho do inóculo: 10 discos de micélio (10) e 20 discos de micélio (20). Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas em algumas barras devido aos desvios pequenos entre as médias.

Observa-se que as maiores atividades foram obtidas nos ensaios nos quais houve a extração do óleo de semente de uva. Deve-se considerar que nestes ensaios, o meio fermentado foi liofilizado, ressuspensionado em 5 mL e então removido o óleo residual por extração com hexano. O processo de liofilização provavelmente concentrou a enzima gerando maiores valores de atividade enzimática. De qualquer maneira, os experimentos com maior carga de inóculo geraram os melhores resultados. Em relação a concentração de óleo de semente de uva e considerando a condição com 20 discos de micélio e extração do óleo residual, a maior atividade enzimática foi obtida na seguinte sequência: $6 > 8 > 4 > 2 \text{ mL.L}^{-1}$. Para os resultados da adição de 2 e 4 mL.L^{-1} de óleo no meio fermentado, a atividade enzimática foi igual a zero ao adicionar-se 10 discos de micélio, e após extração com n-hexano, porém, ao se trabalhar com 20 discos de micélio as atividades foram determinadas para ambas as condições (MF e EH). Esses resultados indicam que o tamanho de inóculo ao se adicionar 10 discos de micélio não foi suficiente para induzir a produção de lipases, ao se adicionar menos que 8 mL.L^{-1} de óleo de semente de uva. Na condição com 6 mL.L^{-1} de óleo de semente de uva pode-se observar uma baixa atividade lipolítica nas 2 condições fazendo a determinação de atividade diretamente no meio fermentado, mas a maior atividade só foi obtida quando uma grande quantidade de óleo foi adicionada (8 mL.L^{-1}).

Em relação aos ensaios com 20 discos de micélio, em ambas as condições, MF e EH, foram observados o mesmo perfil de aumento de atividade, onde houve crescimento até a adição de 6 mL.L^{-1} de óleo e uma

queda com 8 mL.L^{-1} . Isso pode ter acontecido pois após a produção de lipases, o óleo presente em excesso pode interagir com o sítio ativo da enzima, bloqueando o contato com o substrato e a formação da interface com o meio aquoso para que ocorresse a reação de hidrólise.

A maior atividade ($107,91 \text{ U.mL}^{-1}$) foi obtida com 6 mL.L^{-1} de óleo de semente de uva, adicionando-se 20 discos de micélio de inóculo, sendo que, pra essa condição, a atividade do meio fermentado liofilizado e ressuspendido em solução tampão, antes da extração com n-hexano, foi de $41,53 \text{ U.mL}^{-1}$, um aumento de quase 2,6 vezes. Após estabelecimento da melhor condição de produção, as enzimas foram sintetizadas em grande quantidade, liofilizadas e o óleo foi extraído com n-hexano para aplicação na imobilização em suporte hidrofóbico por adsorção.

3.3. Testes de imobilização em diferentes suportes hidrofóbicos

Os suportes hidrofóbicos são amplamente utilizados nos estudos com lipases, sendo dois deles testados neste trabalho: octil-sepharose (C8) e octadecil-sepabeads (C18). A diferença entre eles está na hidrofobicidade, sendo o segundo muito mais hidrofóbico devido a maior cadeia carbônica (41) e, portanto, com poder superior de adsorção das enzimas por interação interfacial.

Na figura 7 são mostradas as bandas de eletroforese referentes às proteínas adsorvidas nos 2 testes de imobilizações: A) imobilização em suporte octadecil-sepabeads por 30 minutos seguido de imobilização em

suporte octil-sepharose por 2 horas, e B) imobilização em suporte octil-sepharose por 1 hora, seguido por imobilização em suporte octadecil-sephabeads por 1 hora e meia. Além das bandas das imobilizações, podem ser vistas as bandas referentes a enzima livre liofilizada solubilizada em tampão e os sobrenadantes das imobilizações.

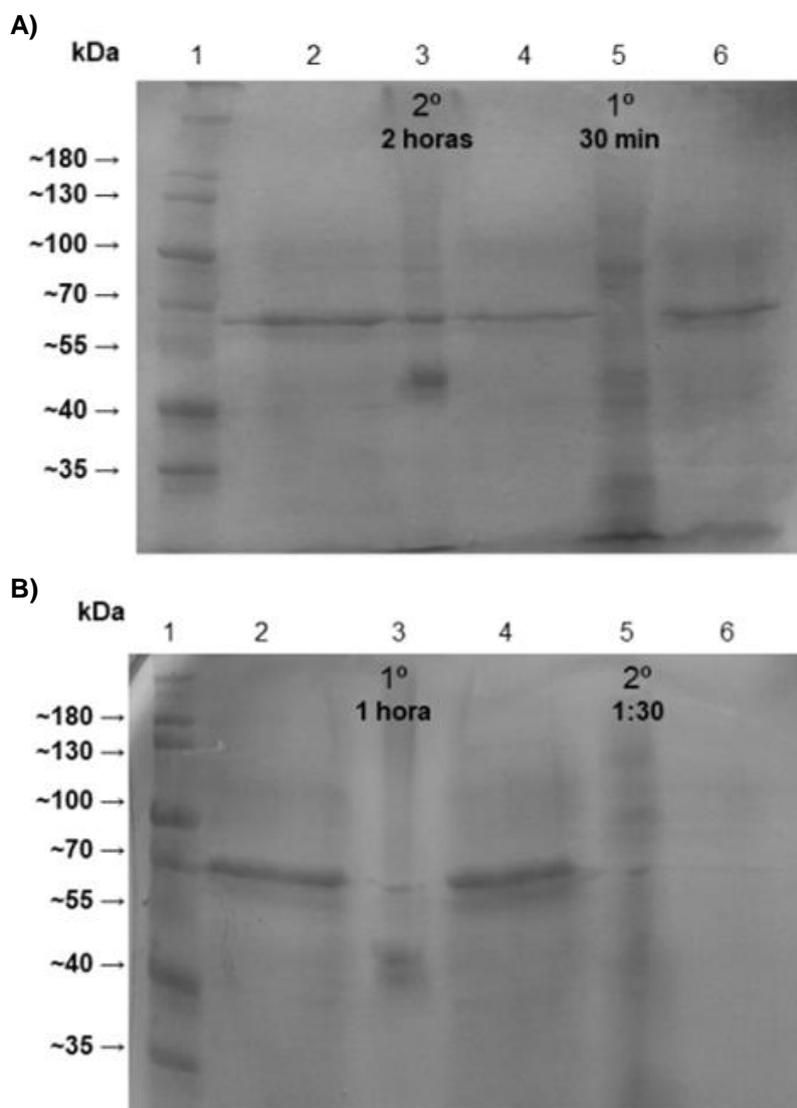


Figura 7. Géis de eletroforese das imobilizações da lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727: A) imobilizada por 30 minutos em suporte octadecil-sephabeads seguido de 2 horas em octil-sepharose, e B) imobilizada por 1 hora em octil-sepharose seguido de 1 hora e meia em octadecil-sephabeads. Os números representam: 1) padrão de peso molecular, 2) solução de enzima livre liofilizada ($0,1 \text{ g.mL}^{-1}$), 3) lipase imobilizada em octil-sepharose (C8), 4)

sobrenadante da imobilização em octil-sepharose, 5) lipase imobilizada em octadecil-sepabeads (C18), e 6) sobrenadante da imobilização em octadecil-sepabeads.

Observa-se que no primeiro teste de imobilização (gel A) houve a adsorção de uma grande quantidade de enzimas presentes no meio fermentado (coluna 5), onde a solução enzimática foi imobilizada primeiramente em suporte com maior hidrofobicidade (C18) por 30 minutos, o que não promoveu uma purificação do meio fermentado. No segundo teste (gel B), em 1 hora de imobilização em suporte octil sepharose (C8), foi possível verificar a presença de menor quantidade de bandas (coluna 3), porém, a banda de peso molecular de ~45 kDa foi mais evidente. Nesta banda, encontra-se a enzima de interesse, o que foi confirmado após a dosagem de atividade de todas as frações aplicadas no gel de eletroforese. Ao imobilizar a lipase no suporte C8 por 1 hora, a atividade enzimática foi 22% em relação a atividade do meio fermentado liofilizado antes da imobilização (colunas 2 de ambos os géis) enquanto o sobrenadante não apresentou atividade lipolítica (coluna 4 do gel B).

A estratégia de imobilizar em suporte mais hidrofóbico (C18), seguido de um menos hidrofóbico (C8), foi promover uma limpeza de possíveis resíduos da fermentação (óleo residual que não foi removido pela extração com hexano, outras enzimas produzidas em menor quantidade, e proteínas, por exemplo), para que a enzima de interesse fosse adsorvida numa segunda etapa.

Após verificar que a imobilização em suporte octil-sepharose também promovia a purificação da lipase, foi aumentado o tempo de reação do meio fermentado com o suporte para 1 hora e meia, e foram realizados testes a fim de aumentar a capacidade de imobilização da enzima no suporte, teste mostrado na seção a seguir.

3.4. Imobilização da lipase em suporte octil-sepharose

No estudo de imobilização da lipase microbiana em suporte hidrofóbico empregou-se 5 ciclos de imobilização a fim de ter a maior concentração de enzima adsorvida no suporte. A figura 8 apresenta os resultados de atividade lipolítica para cada ciclo de imobilização, sendo 0 (zero) representado pela atividade inicial da enzima presente no sobrenadante (meio fermentado) após ressuspensão do meio fermentado liofilizado e extração do óleo residual com n-hexano. A suspensão da imobilização (linha cheia) é composta pelo meio reacional total, onde estão o meio fermentado e o suporte, portanto a atividade dosada se refere ao total de enzimas presentes no meio. Já no sobrenadante (linha tracejada), o meio reacional foi filtrado, separando o suporte contendo as enzimas adsorvidas no tempo de reação, do meio fermentado contendo enzimas livres que não reagiram com o suporte. Os valores de atividade das suspensões foram expressos no gráfico com os valores dos respectivos sobrenadantes subtraídos.

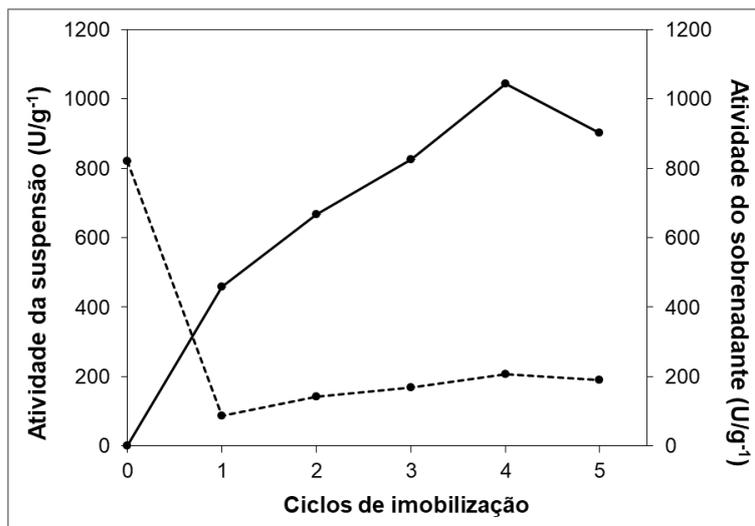


Figura 8. Atividade enzimática (U.g^{-1}) da suspensão (linha cheia) e do sobrenadante da imobilização (linha tracejada), nos 5 ciclos de imobilização em cascata realizados no suporte octil-sepharose, por adsorção hidrofóbica. Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias.

A maior atividade enzimática obtida das suspensões foi após 4 ciclos de imobilização ($1043,72 \pm 54,10 \text{ U.g}^{-1}$), sendo que cada ciclo teve a duração de 1 hora e meia. Foi observado, a partir de testes anteriores, que a imobilização por ciclos de 1 hora e meia, trocando a solução enzimática a cada ciclo, apresentou melhores resultados do que imobilizar por mais tempo utilizando a mesma solução enzimática, pois o contato prolongado poderia favorecer a adsorção de outros compostos do meio fermentado que não fosse a enzima de interesse. Dessa forma, a atividade enzimática teve um aumento até o 4º ciclo de imobilização, atingindo um rendimento de 151,32% e aumento de 136% na atividade específica, comparando os resultados na primeira e o quarto ciclo de imobilização. Deve-se considerar também que um aumento da atividade pode ocorrer após um processo de

purificação devido a remoção de outras enzimas ou proteínas que podem atuar como inibidores enzimáticos. Assim, com a enzima mais purificada seu sítio ativo fica mais exposto podendo apresentar uma interação superior com o substrato.

O aumento da atividade dos sobrenadantes das imobilizações pode ter ocorrido devido ao processo de desagregação das lipases presentes no meio fermentado. Como o sítio ativo das lipases apresenta alta hidrofobicidade, estas enzimas podem formar aglomerados por interação hidrofóbica. O contato e o processo de adsorção com o suporte hidrofóbico na reação de imobilização, pode promover a desagregação das enzimas que passam a interagir com o suporte e assim o sítio ativo é exposto para reação com o substrato.

No processo de imobilização por adsorção, o simples contato entre a enzima e o suporte faz com que ocorra a imobilização. As ligações responsáveis por este tipo de imobilização são forças de Van der Waals, interações iônicas, adsorção física ou interação hidrofóbica entre os grupos da enzima e do suporte (42). Todas essas ligações citadas são fracas e a enzima pode ser desorvida em simples modificações no meio, como, por exemplo, a temperatura. Pode-se observar que no 5º ciclo de imobilização, a atividade diminuiu isto pode ter ocorrido devido a alguma interferência no meio reacional que favoreceu o processo de desorção da enzima.

Segundo Fernandez-Lafuente et al. (43) o octil-agarose 4BCL (mesmo suporte empregado neste estudo) pode ser considerado um suporte com interface hidrofóbica densa, uma vez que uma molécula de proteína pode

interagir com 60 a 80 resíduos de octil da superfície do suporte (1 mL contém 40 mmol de grupos octil) podendo imobilizar de 20 a 30 mg.mL⁻¹ de proteína de tamanho médio. Por esta razão, a imobilização em cascata foi vantajosa para que houvesse uma sobrecarga de enzimas oferecidas e assim ocupar os espaços disponíveis para contato entre a lipase e a interface do suporte.

A Figura 9 mostra a imagem de eletroforese em gel de poliacrilamida, feita com 1) padrão de peso molecular (kDa); 2) meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão acetato 5 mM pH 5; 3) meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão acetato 5 mM pH 5 após extração com n-hexano; 4) enzima imobilizada em cascata de octil-sepharose empregando 4 ciclos; e 5-8) sobrenadantes de cada um dos 4 ciclos de imobilização.

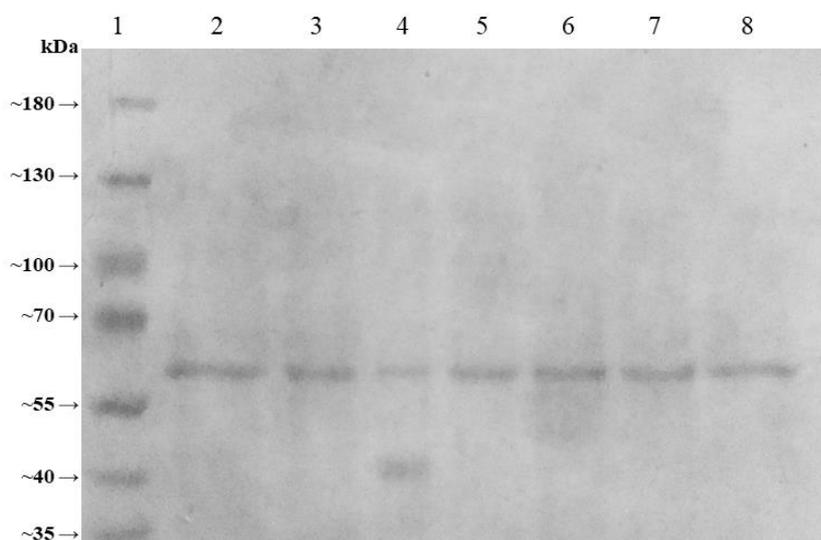


Figura 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page): 1) Padrão de peso molecular (kDa); 2) meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão acetato 5 mM pH 5; 3) meio fermentado liofilizado ressuspendido em tampão acetato 5 mM pH 5 após extração com n-hexano; 4) enzima imobilizada em octil-sepharose, em cascata (4 ciclos); e 5-8) sobrenadantes das imobilizações em cascata.

Pode-se observar que as bandas das colunas 2 e 3 referentes aos meios fermentados sem purificação apresentaram uma banda próxima ao peso molecular de ~64 kDa, banda também observada nos sobrenadantes das imobilizações (5, 6, 7 e 8). A coluna 4, referente à aplicação das enzimas imobilizadas em octil-sepharose após 4 ciclos, manteve a banda em ~64 kDa, visualmente mais clara, mais uma banda de ~45 kDa. Como visto anteriormente, após 4 ciclos de imobilização por adsorção a enzima apresentou a atividade mais alta, portanto, sugere que a banda de ~45kDa se refere às enzimas que se ligaram ao suporte, sendo estas as enzimas de interesse no presente trabalho pois também apresentaram alta atividade lipolítica (Figura 8). O processo de imobilização por adsorção interfacial em suporte hidrofóbico é um método simples de interação entre enzima e suporte mas que se mostra vantajosa pois em apenas uma etapa pode ocorrer também a purificação da enzima (29), como observado neste trabalho.

3.5. Caracterização da enzima imobilizada em relação ao pH e temperatura

Os testes para verificar a influência do pH e da temperatura na atividade da lipase imobilizada em suporte octil-sepharose foram realizados e os resultados de pH e temperatura ótimas estão apresentados na Figura 9. A estabilidade da enzima livre liofilizada também está apresentado na Figura 10.

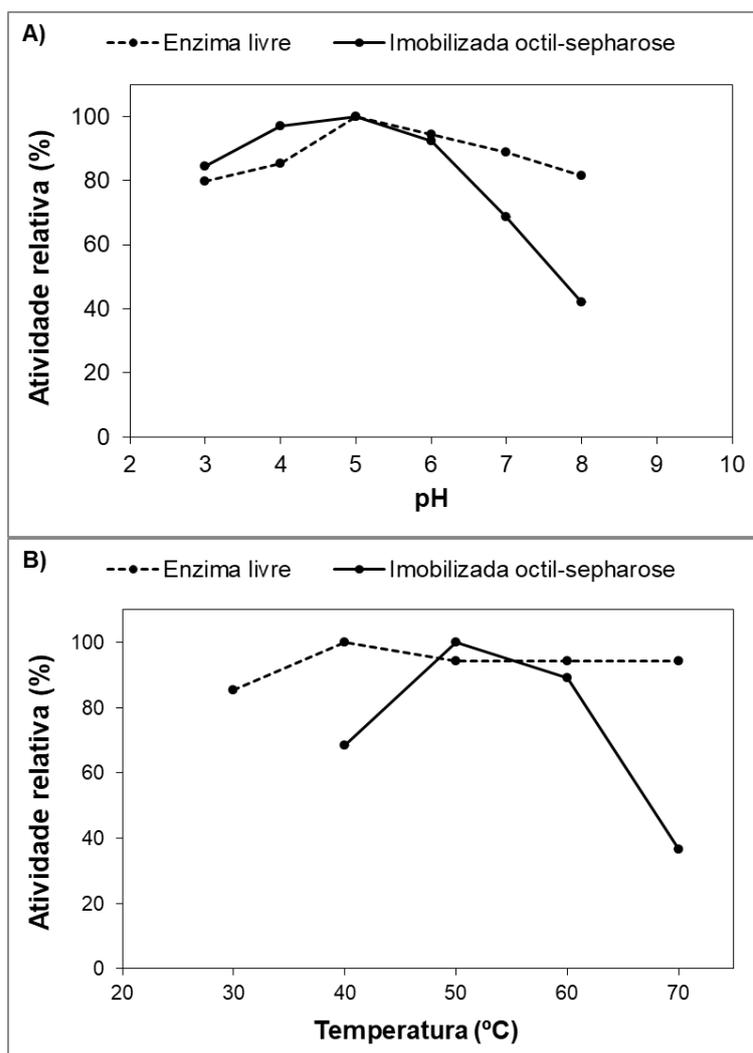


Figura 10. Atividade da lipase produzida por cultivo submerso de *Aspergillus* sp. DPUA 1727 na sua forma livre liofilizada (linha tracejada) e imobilizada em octil-sepharose (linha cheia) em relação a: pH ótimo (A) e temperatura ótima (B). Os ensaios foram realizados em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade máxima obtida com a enzima livre (pH 5, 59,20 U.mL⁻¹; 40°C, 37,16 U.mL⁻¹) e imobilizada (pH 5, 699,45 U.g⁻¹; 50°C, 1103.83 U.g⁻¹).

Após o processo de imobilização, não houve modificação nas faixas de pH ótimo obtido com a enzima livre e imobilizada. Após teste estatístico de análise de variância (ANOVA *one way*), com pós-teste de Tukey, observou-se que a enzima imobilizada apresentou maiores atividades em pH

de 4, 5 e 6 ($p=0,0475$, sem diferença no pós-teste) e a enzima livre apresentou maior atividade em pH 5, seguido do pH 6 ($p=0,0397$). A temperatura ótima da enzima imobilizada foi de 50°C ($p<0,001$) e a enzima livre apresentou igualdade entre as temperaturas avaliadas, sendo que somente as temperaturas de 30 e 40°C apresentaram diferença estatística ($p=0,0117$). Para continuação dos testes de caracterização da enzima imobilizada, foi estabelecido o pH de 5 e a temperatura de 50°C.

Em trabalho realizado por Almeida et al. (16), também não foi observado deslocamento da faixa de pH ótimo ao trabalhar com lipase produzida por *Candida viswanathii*, enzima livre e imobilizada em octil sepharose, sendo obtidos resultados de pH ótimo de 4, e temperatura de 45°C, semelhantes aos do presente trabalho. Entretanto, Palomo et al. (41) observou deslocamento da faixa ótima de reação em imobilização de lipase em suporte hidrofóbico, onde a enzima imobilizada apresentou atividade máxima em temperatura de 50°C e a enzima livre na temperatura de 40°C.

O processo de imobilização por interação hidrofóbica envolve a modificação estrutural da cadeia polipeptídica que forma uma “tampa” que recobre o sítio ativo da enzima (22). Mudanças nas faixas de pH podem estar associadas com a ocorrência de alterações conformacionais da enzima após a imobilização, e também na concentração de íons (44).

Em relação à temperatura, a enzima livre apresentou valores de atividade próximos entre as faixas testadas, sendo que em todas as condições testadas, a atividade da enzima foi superior a 80%. A enzima imobilizada foi mais sensível às variações de temperatura, tendo

apresentado seus melhores valores em temperaturas de 50 e 60°C. Em 70°C, a atividade caiu cerca de 60% em relação à obtida em 50°C. Isso pode ter ocorrido devido à instabilidade da ligação entre enzima e suporte, conseqüentemente afetando na perda de atividade. De acordo com Gomes et al. (44), a temperatura influencia a formação do complexo enzima-substrato, aumentando o número de colisões produtivas por unidade de tempo, mas quando exposto a altas temperaturas, a perda de estrutura terciária pode ocorrer devido à desnaturação da proteína. Em baixas temperaturas a energia cinética para a formação pode não ser suficiente, fazendo com que a reação diminua e conseqüentemente sua atividade.

A estabilidade da lipase imobilizada foi avaliada em estudos ao longo de 24 h nos valores de pH entre 3 e 8 (Figura 11) enquanto que a estabilidade em relação a temperatura foi determinada na faixa entre 30 e 70°C (Figura 12).

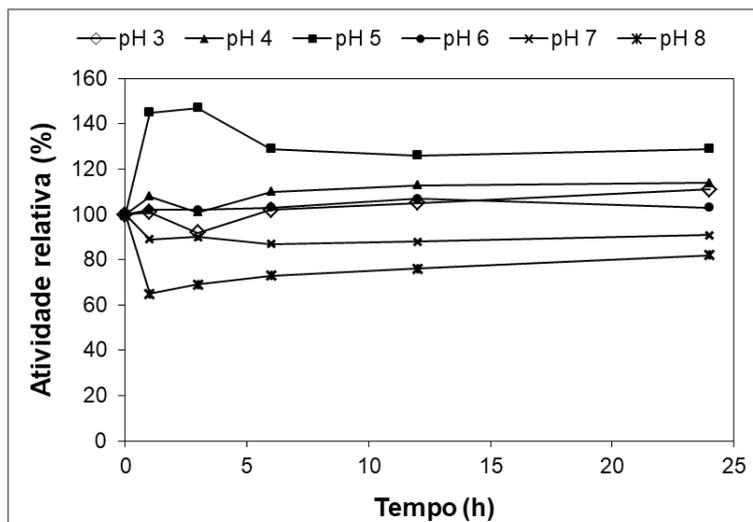


Figura 11. Estabilidade da enzima imobilizada em octil-sepharose, ressuspenso em $0,1 \text{ g.mL}^{-1}$: tampão glicina-HCl 5 mM (pH 3), tampão acetato 5 mM (pH 4 e 5) e tampão fosfato 5 mM (pH 6, 7 e 8) após incubação a 25°C por até 24 horas. Ensaio realizado em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida no tempo zero das dosagens com cada pH.

A enzima imobilizada apresentou estabilidade acima de 60% independente do valor de pH avaliado. Este resultado demonstra que a enzima imobilizada estabilizou a enzima, visto que a lipase na sua forma apresentou uma perda de, aproximadamente, 60% em pH 8,0 após 24 h de incubação (resultados reportados no Capítulo 1, Figura 5). Entre os valores de pH avaliados, na faixa entre 3 e 6, a atividade relativa ao final de 24 horas ficou acima 100%. A enzima foi mais estável no pH 5, no qual inicialmente a atividade aumentou e após 6 horas de incubação entrou em equilíbrio alcançando 129% em relação ao tempo inicial e permaneceu até o fim do estudo

Comportamento inverso foi observado por Chiou et al. (15) em teste realizado com lipase imobilizada em esferas de quitosana, porém com

incubação por apenas 1 hora, à 25°C. Nos ensaios de estabilidade em relação ao pH, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade em pH 7, enquanto a enzima livre foi mais estável na faixa de 3 a 6.

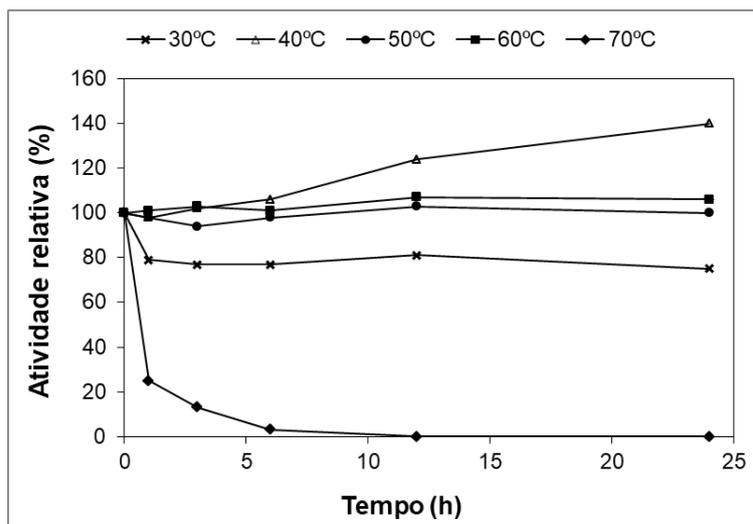


Figura 12. Estabilidade em temperatura, na faixa de 30 a 70°C por até 24 horas. Enzima imobilizada ressuspensa na concentração de 0,1 g.mL⁻¹ em tampão acetato 5 mM (pH 5). Ensaios realizados em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida no tempo zero das dosagens em cada temperatura testada.

Similarmente à estabilidade ao pH, a enzima imobilizada apresentou maior estabilidade em maiores faixas de temperatura, em comparação à enzima livre. Nas temperaturas de 40, 50 e 60°C a enzima imobilizada apresentou atividade relativa acima de 100% no tempo zero, sendo a maior obtida a 40°C ao final de 24 horas, com 140% da atividade inicial. Em trabalho realizado por Almeida et al. (16), a imobilização da lipase em suporte octil-sepharose foi realizado pelo empacotamento e posterior

imobilização em coluna e, nestas condições, a lipase apresentou melhores atividades em 40 e 45°C, com queda de 50% da atividade em 50°C após incubação por 180 minutos, e perda de toda atividade em 60°C após 9 minutos. Esses dados mostram que a lipase imobilizada em octil-sepharose, do presente trabalho, apresentou uma maior capacidade em manter-se estável em um faixa maior de temperatura (40, 50 e 60°C), por mais tempo de incubação (24 horas), comparada ao estudo de Almeida et al. (16).

A partir destes resultados, padronizou-se a metodologia da dosagem de atividade no pH ótimo (tampão acetato de sódio pH 5).

3.6. Teste de atividade da enzima imobilizada após diversos ciclos

Uma das vantagens de se realizar o processo de imobilização de uma enzima é aumentar sua estabilidade e usar diversas vezes o mesmo derivado por diversos ciclos. Desta maneira, foi realizado um teste de sua atividade após 20 ciclos, utilizando o *p-nitrofenil propionato* como substrato, e foi avaliada a sua estabilidade no decorrer dos ciclos de reutilização do derivado, conforme resultados apresentados na figura 13. Os resultados foram expressos por atividade relativa (Eq. 1), onde a atividade inicial, considerada 100%, é referente à primeira atividade enzimática medida com o derivado.

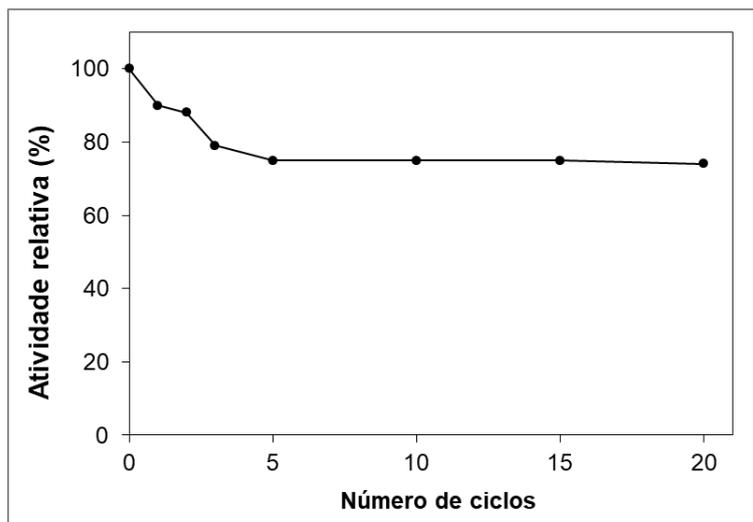


Figura 13. Teste de atividade da enzima imobilizada em octil-sepharose por 20 ciclos de dosagem de atividade enzimática. Ensaios realizados em triplicata, apresentados pelas barras de desvio padrão da média, embora não possam ser observadas devido aos desvios pequenos entre as médias. Foi considerada 100% a atividade obtida na primeira dosagem utilizando a enzima imobilizada ($1038,25 \text{ U.g}^{-1}$).

Houve diminuição da atividade até o quinto ciclo de reutilização da enzima imobilizada, atingindo 75% da atividade inicial, permanecendo nessa porcentagem até o final dos testes de atividade da enzima imobilizada (20º ciclo). A imobilização em suporte por adsorção interfacial em octil-sepharose é considerado um método fácil de imobilização e é amplamente utilizado visando a purificação do meio em que foi produzido (45–48). Desta maneira, neste trabalho, a imobilização da lipase foi feita, também, com a finalidade de purificação do meio fermentado, em concordância com Tacias-Pascacio et al. (29), que diz que em apenas uma etapa, é possível imobilizar, purificar e estabilizar a lipase. Isso ocorre, pois, este método imobiliza a enzima mantendo a conformação aberta da lipase, e assim facilitando o contato do substrato com o sítio ativo da enzima. A partir do resultado do teste de atividade do derivado imobilizado, é possível afirmar que este apresentou

uma boa capacidade de reutilização, atendendo a um dos principais objetivos da imobilização, mostrando que esse método é capaz de estabilizar a atividade da lipase imobilizada.

3.7. Aplicação da lipase imobilizada para a biossíntese de propionato de isoamila

As lipases apresentam diversas aplicações industriais, dentre elas, na síntese de ésteres que são a base dos bioaromas. Dessa maneira, o objetivo da etapa final deste trabalho foi avaliar a biossíntese de propionato de isoamila empregando a lipase imobilizada através de um planejamento fatorial 2^3 na qual as variáveis independentes analisadas foram: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), relação ácido:álcool (v/v) e massa de enzima imobilizada (mg) sobre a variável resposta produção de propionato de isoamila. O planejamento experimental é uma ferramenta estatística onde se avalia o efeito de diversos fatores sobre a variável resposta, a partir de combinações diversas (49). Os resultados do planejamento podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados do planejamento fatorial 2^3 , avaliando as variáveis "temperatura ($^{\circ}\text{C}$)", "relação ácido: álcool" e "enzima imobilizada (mg)", em 3 níveis. Valores obtidos na síntese de propionato de isoamila (g.L^{-1}), com desvio padrão. Letras iguais representam igualdade da média das variáveis em teste com 5% de significância.

Ensaio	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Relação ácido:álcool (v/v)	Enzima imobilizada (mg)	Propionato de isoamila (g/L)
1	-1 (40)	-1 (1:1)	-1 (125)	$1,08 \pm 0,09$ ^f
2	1 (60)	-1 (1:1)	-1 (125)	$3,96 \pm 1,06$ ^{b,c}
3	-1 (40)	1 (1:4)	-1 (125)	$1,55 \pm 0,02$ ^e
4	1 (60)	1 (1:4)	-1 (125)	$5,48 \pm 0,53$ ^a
5	-1 (40)	-1 (1:1)	1 (375)	$0,98 \pm 0,29$ ^{e,f}
6	1 (60)	-1 (1:1)	1 (375)	$3,08 \pm 0,68$ ^{b,d}
7	-1 (40)	1 (1:4)	1 (375)	$1,21 \pm 0,07$ ^e
8	1 (60)	1 (1:4)	1 (375)	$3,83 \pm 0,11$ ^c
9 - 12*	0 (50)	0 (1:2)	0 (250)	$2,75 \pm 0,25$ ^d

* Ponto central

A partir dos resultados obtidos observa-se que houve a produção de propionato de isoamila, porém, a concentração obtida e a porcentagem de esterificação (Figura 13) foi inferior a 10%. Assim, foram realizados experimentos sem a presença da enzima imobilizada nas mesmas condições do planejamento fatorial para verificar se a presença da enzima favoreceu o processo de esterificação. Estes resultados estão apresentados na Figura 14.

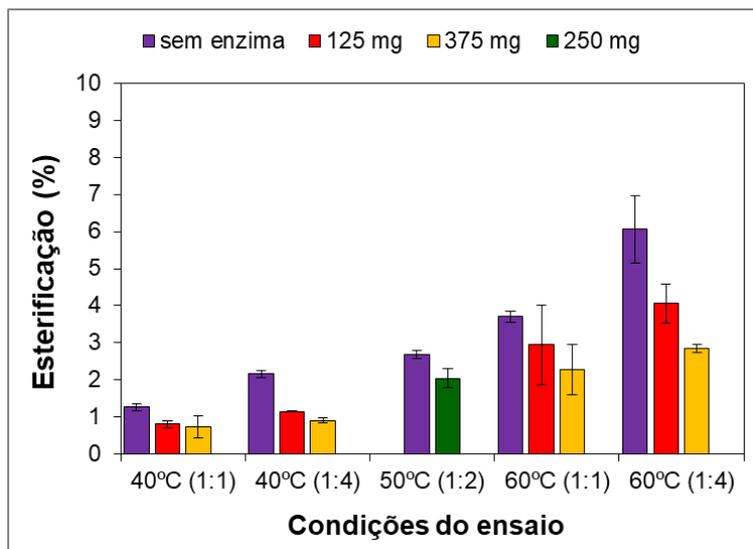


Figura 14. Porcentagem de esterificação de cada condição testada no planejamento fatorial, sendo que as colunas representam os valores obtidos de acordo com a quantidade de enzima adicionada (mg) e sem adição de enzima, em relação à variação de temperatura (40, 50 e 60°C) e relação entre ácido:álcool (1:1, 1:2 e 1:4 v/v) nos ensaios. Ensaio realizado em triplicata e as barras de erro representam desvio padrão da média.

Observa-se que nos ensaios sem enzima foram obtidas as maiores porcentagens de esterificação (%) em todas as condições testadas. Dentre todos os ensaios realizados, a maior concentração de propionato de isoamila foram obtidos com adição à 60°C, mostrando que a temperatura exerce o principal efeito no processo de esterificação. Este resultado também foi obtido no planejamento fatorial, porém, como na ausência da enzima houve maior porcentagem de esterificação do que na presença, o estudo de aplicação da enzima imobilizada na obtenção de propionato de isoamila não foi satisfatório e os resultados estatísticos do planejamento fatorial não foram apresentados. A presença do éster propionato de isoamila foi feita pela presença do pico no cromatograma dos padrões utilizados na síntese (Anexo 2). A escolha do éster propionato de isoamila foi feita baseado no

estudo de especificidade nos diferentes ésteres de *p-nitrofenil*, apresentado na sessão 3.1., onde a enzima apresentou o melhor resultado quando utilizado o propionato como substrato.

De acordo com Abbas et al. (50), a reação de formação de ésteres de aroma parece ser dependente do tamanho da cadeia carbônica do ácido e do álcool utilizados, afetando a especificidade da enzima. O ácido propiônico possui uma cadeia carbônica muito curta (C3) e já foi relatado que este ácido atua como um doador acila que apresentou pouca ou nenhuma eficiência na síntese de ésteres, provavelmente pela inativação de suas propriedades nas condições da síntese (51). O álcool isoamílico é um álcool de cadeia curta e apresenta uma cadeia de ramificação. No trabalho de Abbas et al. (50), os autores dizem que os grupos laterais do substrato ácido ou álcool mostraram reduzir a atividade da enzima porém, esse efeito foi eliminado quando o grupo lateral estava localizado mais longe do carbono (50). A afinidade de uma enzima lipase com diferentes tipos de álcoois se deve à energia de ligação que é liberada quando o substrato se liga ao sítio ativo, sendo que, com alguns substratos, essa energia não é suficiente para que haja mudança de conformação da lipase, para uma forma ativa de catálise de reações com eficiência (50).

Além disso, sabe-se a partir da literatura que em uma reação de esterificação catalisada por lipase, a primeira etapa é a ligação preferencial da molécula do ácido pela enzima, posteriormente, um aumento na concentração do álcool pode promover a ligação de moléculas do álcool com a lipase durante a primeira etapa da reação, competindo com o ácido, o que

leva a baixas taxas de esterificação (Bayramoglu et al., 2011). Nos ensaios realizados, um aumento na concentração da enzima imobilizada acarretou em menores porcentagem de esterificação, assim, pode ter ocorrido uma maior interação entre a enzima e o álcool o que desfavoreceu o processo de esterificação.

Sobre o uso de solventes orgânicos na síntese, Krishna et al. (32) mostraram que solventes que apresentam $\log P$ (parâmetro utilizado para descrever a polaridade dos solventes a partir do coeficiente de partição de um solvente entre água e octanol, em um sistema de fases) maior de 3, apresentaram maiores taxas de esterificação. O uso de solventes hidrofóbicos preservam a atividade catalítica da enzima, sem perturbar sua camada micro-aquosa, como é o caso do heptano ($\log P=4$) (32), utilizado neste trabalho. Assim, o solvente provavelmente não foi o responsável pelos resultados obtidos.

De qualquer maneira, para concluir que a lipase imobilizada de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 pode ser empregada na biossíntese de ésteres estudos de outras condições devem ser efetuados.

4. Conclusões

A lipase de *Aspergillus sp.* DPUA 1727 pode ser imobilizada em suporte hidrofóbico, nomeadamente octil-sepharose. Nos testes de estabilidade, a enzima imobilizada apresentou valores diferentes da sua

forma livre, sendo mais estável em temperaturas mais altas e em valores de pH mais ácidos. A atividade ótima foi em temperatura de 50°C e observou-se um platô de atividade ótima valores de pH 4, 5 e 6. No teste de atividade, a enzima apresentou uma boa capacidade de reusabilidade, mantendo 75% da atividade inicial a partir do 5º ciclo de reuso, até 20 ciclos testados, mostrando que a enzima imobilizada em octil-sepharose mantém sua atividade e apresenta alto teor de pureza.

A aplicação da enzima imobilizada na síntese do éster propionato de isoamila não apresentou taxa de conversão satisfatória. Sua aplicação merece ser estudada mais a fundo devido à especificidade da enzima em relação ao tamanho da cadeia do álcool e do ácido a ser utilizado na síntese.

Referências

1. Geoffry K, Achur RN. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2018;14(November 2017):241–53.
2. Das A, Bhattacharya S, Shivakumar S, Shakya S, Sogane SS. Coconut oil induced production of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamaris* under submerged fermentation. *J Basic Microbiol.* 2017;57(2):114–20.
3. Jia J, Yang X, Wu Z, Zhang Q, Lin Z, Guo H, et al. Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from

- Aspergillus niger* using response surface methodology. Biomed Res Int. 2015;2015:1–8.
4. Wolski E, Menusi E, Remonatto D, Vardanega R, Arbter F, Rigo E, et al. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. LWT - Food Sci Technol. 2009;42(9):1557–60.
 5. Agueiras ECG, de Barros DSN, Fernandez-Lafuente R, Freire DMG. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. Renew Energy [Internet]. 2019;130:574–81.
 6. Riyadi FA, Alam MZ, Salleh MN, Salleh HM. Optimization of thermostable organic solvent-tolerant lipase production by thermotolerant *Rhizopus* sp. using solid-state fermentation of palm kernel cake. 3 Biotech. 2017;7(5):1–11.
 7. Venkatesagowda B, Ponugupaty E, Barbosa AM, Dekker RFH. Solid-state fermentation of coconut kernel-cake as substrate for the production of lipases by the coconut kernel-associated fungus *Lasiodiplodia theobromae* VBE-1. Ann Microbiol. 2015;65(1):129–42.
 8. Reinehr CO, Treichel H, Tres MV, Steffens J, Briiç½o VB, Colla LM. Successive membrane separation processes simplify concentration of lipases produced by *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. Bioprocess Biosyst Eng. 2017;40(6):843–55.
 9. Villeneuve P, Muderhwa JM, Graille J, Haas MJ. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological

- approaches. *J Mol Catal - B Enzym*. 2000;9(4-6):113-48.
10. Geoffry K, Achur RN. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;14(March):241-53.
 11. Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale D V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresour Technol*. 2009;100(3):1486-90.
 12. Sethi BK, Nanda PK, Sahoo S. Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10. *Brazilian J Microbiol [Internet]*. 2016;47(1):143-9.
 13. Lai O-M, Lee Y-Y, Phuah E-T, Akoh CC. Lipase/esterase: properties and industrial applications [Internet]. Reference Module in Food Science. Elsevier; 2018;1-11.
 14. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip [Internet]*. 2015;29(2):205-20.
 15. Chiou SH, Wu WT. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. *Biomaterials*. 2004;25(2):197-204.
 16. Almeida AF de, Terrasan CRF, Terrone CC, Tauk-Tornisielo SM, Carmona EC. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochem [Internet]*. 2018;65(May):71-80.

17. Stoytcheva M, Montero G, Gochev V, Valdez B. The immobilized lipases in biodiesel production. *Biodiesel - Qual Emiss By-Products* [Internet]. 2011;15.
18. Osuna Y, Sandoval J, Saade H, López RG, Martínez JL, Colunga EM, et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015;38(8):1437–45.
19. Liu X, Fang Y, Yang X, Li Y, Wang C. Electrospun epoxy-based nanofibrous membrane containing biocompatible feather polypeptide for highly stable and active covalent immobilization of lipase. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2018;166:277–85.
20. Xie W, Zang X. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- γ -Fe₂O₃ nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. *Food Chem* [Internet]. 2017;227:397–403.
21. Rivero C, Palomo J. Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase at alkaline pH and their application in the regioselective deprotection of per-O-acetylated thymidine. *Catalysts* [Internet]. 2016;6(8):115.
22. Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol.* 2015;71:53–7.
23. Bassi JJ, Todero LM, Lage FAP, Khedy GI, Ducas JD, Custódio AP, et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *Int J Biol Macromol*

- [Internet]. 2016;92:900–9.
24. Ferreira IM, de S. Ganzeli L, Rosset IG, Yoshioka SA, Porto ALM. Ethylic biodiesel production using lipase immobilized in silk fibroin-alginate spheres by encapsulation. *Catal Letters*. 2017;147(1):269–80.
 25. Zubiolo C, Santos RCA, Carvalho NB, Soares CMF, Lima AS, De Aquino Santana LCL. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2014;37(9):1781–8.
 26. Souza RL, Faria ELP, Figueiredo RT, Fricks AT, Zanin GM, Santos OAA, et al. Use of polyethylene glycol in the process of sol-gel encapsulation of *Burkholderia cepacia* lipase. *J Therm Anal Calorim*. 2014;117(1):301–6.
 27. Rehman S, Bhatti HN, Bilal M, Asgher M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Pencillium notatum* lipase enzyme with improved activity, stability and reusability characteristics. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016;91:1161–9.
 28. Zhang WW, Yang XL, Jia JQ, Wang N, Hu CL, Yu XQ. Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. *J Mol Catal B Enzym* [Internet]. 2015;115:83–9.
 29. Tacias-Pascacio VG, Peirce S, Torrestiana-Sanchez B, Yates M, Rosales-Quintero A, Virgen-Ortíz JJ, et al. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv*.

- 2016;6(102):100281–94.
30. Palomo JM, Muoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzym.* 2002;19(20):279–86.
 31. Leyva F, Orjuela A, Kolah A, Lira C, Miller D, Rodríguez G. Isoamyl propionate production by reactive distillation. *Sep Purif Technol* [Internet]. 2015;146:199–212.
 32. Krishna SH, Karanth NG. Response Surface Modeling of Lipase – Catalyzed Isoamyl Propionate Synthesis. *J Food Sci.* 2002;67(1):32–6.
 33. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1–2):248–54.
 34. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
 35. Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2015;57(January):40–54.
 36. Nalder TD, Ashton TD, Pfeffer FM, Marshall SN, Barrow CJ. 4-Hydroxy-N-propyl-1,8-naphthalimide esters: New fluorescence-based assay for analysing lipase and esterase activity. *Biochimie* [Internet]. 2016;128–129:127–32.
 37. Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. What distinguishes

- an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 2000;82(11):1033–41.
38. Esteban-Torres M, Mancheño JM, de las Rivas B, Muñoz R. Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations. *LWT - Food Sci Technol*. 2015;60(1):246–52.
 39. de Castro FF, Pinheiro ABP, Nassur CB, Barbosa-Tessmann IP. Mycelium-bound lipase from a locally isolated strain of *Aspergillus westerdijkiae*. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2017;10:321–8.
 40. Syal P, Gupta R. Heterologous expression of lipases YLIP4, YLIP5, YLIP7, YLIP13, and YLIP15 from *Yarrowia lipolytica* MSR80 in *Escherichia coli*: Substrate specificity, kinetic comparison, and enantioselectivity. *Biotechnol Appl Biochem*. 2017;
 41. Palomo JM, Segura RL, Fernández-Lorente G, Pernas M, Rua ML, Guisán JM, et al. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog*. 2004;20(2):630–5.
 42. Jegannathan KR, Abang S, Poncelet D, Chan ES, Ravindra P. Production of biodiesel using immobilized lipase - A critical review. *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(4):253–64.
 43. Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids*. 1998;93(1–2):185–97.
 44. Gomes FM, De Paula A V., Silva GDS, De Castro HF. Determinação

- das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. *Quim Nova*. 2006;29(4):710–8.
45. Fernández-Lorente G, Ortiz C, Segura RL, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Palomo JM. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92(6):773–9.
 46. Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernández-Lafuente R, Huguet J, Guisán JM. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*. 1998;58(5):486–93.
 47. Brabcová J, Demianová Z, Vondrášek J, Jágr M, Zarevúcka M, Palomo JM. Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. *J Mol Catal B Enzym*. 2013;98:62–72.
 48. Volpato G, Filice M, Ayub MAZ, Guisan JM, Palomo JM. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J Chromatogr A*. 2010;1217(4):473–8.
 49. Qourzal S, Bakas I, Barka N, Assabbane A, Ait-Ichou Y. Factorial experimental design for the optimization of β -Naphthol photocatalytic degradation in TiO₂ aqueous suspension. *Can Chem Trans [Internet]*. 2014;2(January):1–11.
 50. Abbas H, Comeau L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* *Enzyme Microb Technol*. 2003;32(5):589–95.

51. Langrand G, Rondot N, Triantaphylides C, Baratti J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. *Biotechnol Lett.* 1990;12(8):581–6.

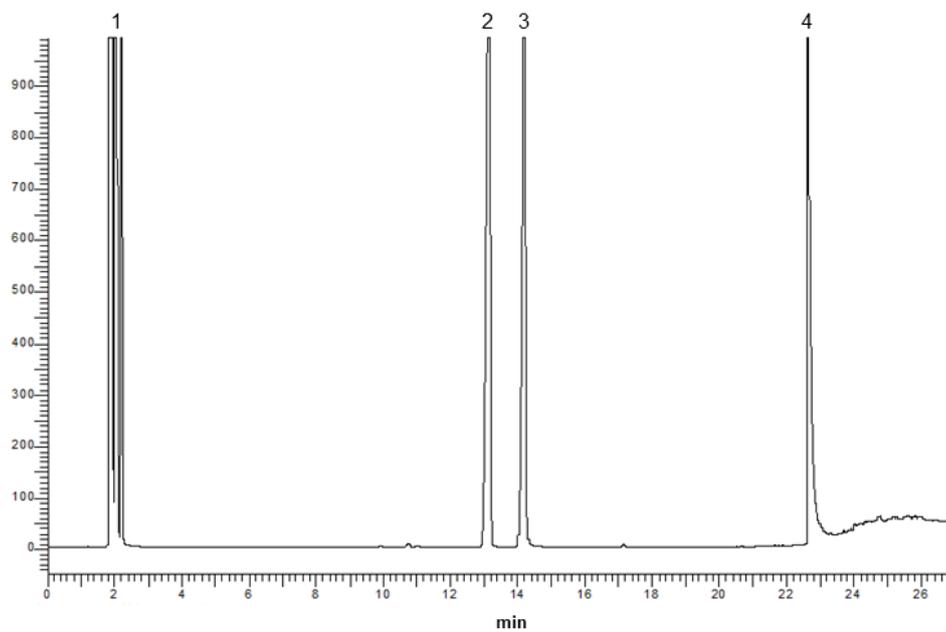
Anexo 1

Síntese de *p*-nitrofenil propionato

Baseado em Gosh et al. Bioorg. Med. Chem. 11 (2003) 629-657.

Adicionar 5 g de *p*-nitrofenol e 6 g de cloreto de propionila em um mistura de 4,32 mL de piridina e 22 mL de diclorometano. A reação ocorre em temperatura ambiente, durante 3 horas, sob agitação constante. Após o tempo de reação, aplicar em placa de TLC, do tempo inicial e final, e correr a cromatografia com fase móvel de hexano:acetato de etila (2:1). Observar a formação de uma mancha única. Extrair 3 vezes em funil de separação com água ácida (HCl) a fase orgânica (debaixo) de coloração marrom. Rotoevaporar a fase orgânica à 40°C, pressão de 500 mm para tirar o diclorometano da mistura. Adicionar éter frio em cada ciclo de rotoevaporação até cristalização. Adicionar éter frio e deixar secar naturalmente por 24 horas. Guardar os cristais em frasco armazenado em freezer (-18°C).

Anexo 2. Cromatograma dos picos dos padrões de 1) solvente, 2) propionato de isoamila, 3) álcool isoamílico e 4) ácido propiônico, na mistura de 7:1:1:1, respectivamente.



2. Considerações finais

A enzima lipase foi produzida pela cepa *Aspergillus sp.* DPUA 1727, com máxima atividade após 96 horas de cultivo submerso, utilizando óleo de semente de uva como fonte de indução de lipase extracelular. Os resultados de produção demonstraram que resíduos agroindustriais podem ser empregados como substratos indutores, sendo a porcentagem de ésteres de ácidos graxos um parâmetro fundamental para a obtenção de enzimas lipolíticas. A enzima produzida foi imobilizada satisfatoriamente em suporte octil-sepharose por adsorção hidrofóbica, processo que purificou e imobilizou a enzima em uma única etapa. Os ensaios de síntese do éster propionato de isoamila mostraram que a interação entre a lipase e o álcool é um fator a ser considerado durante o processo.

Assim, este trabalho apresentou a produção da enzima lipase por uma nova cepa de fungo, isolado na Amazônia empregando um substrato alternativo. Além disso, foi possível imobilizar a enzima por adsorção, o qual se mostrou eficaz pois possibilitou a reutilização do biocatalisador e incremento de sua estabilidade. Desta maneira, a enzima produzida pode ser uma alternativa no uso biotecnológico de catalizadores enzimáticos para fins industriais.

Referências

1. Rivero C, Palomo J. Covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase at alkaline pH and their application in the regioselective deprotection of per-O-acetylated thymidine. *Catalysts* [Internet]. 2016;6(8):115.
2. Dewan SS. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications - BIO030H [Internet]. BCC Research. 2014 [cited 2018 Jun 30]. p. 1–157.
3. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2009;27(6):782–98.
4. Messias JM, Costa BZ da, Lima VMG de, Giese C, Dekker RFH, Barbosa A de M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. *Semin Ciências Exatas e Tecnológicas* [Internet]. 2011;32(2):213–34.
5. Ferreira-Dias S, Sandoval G, Plou F, Valero F. The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. *Electron J Biotechnol*. 2013;16(3):1–38.
6. Jiang Y, Loos K. Enzymatic synthesis of biobased polyesters and polyamides. *Polymers (Basel)*. 2016;8(7).
7. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*. 2001;19(8):627–62.
8. Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-

- Lafuente R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol.* 2015;71:53–7.
9. Tacias-Pascacio VG, Peirce S, Torrestiana-Sanchez B, Yates M, Rosales-Quintero A, Virgen-Ortíz JJ, et al. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* 2016;6(102):100281–94.
 10. Palomo JM, Fernández-Lorente G, Mateo C, Segura RL, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, et al. Purification, immobilization, hyperactivation, and stabilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. In: Guisán JM, editor. *Immobilization Of Enzymes And Cells (Methods in Biotechnology)*. 2nd ed. Humana Press; 2006. p. 449–66.
 11. Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1998;16(9):396–403.
 12. Palomo JM, Segura RL, Fernández-Lorente G, Pernas M, Rua ML, Guisán JM, et al. Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog.* 2004;20(2):630–5.
 13. Contesini FJ, Lopes DB, MacEdo GA, Nascimento MDG, Carvalho PDO. *Aspergillus sp.* lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *J Mol Catal B Enzym.* 2010;67(3–4):163–71.
 14. Padilha GS, Ferreira JF, Castiglioni GL, Alegre RM, Tambourgi EB. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para

- purificação em sistema bifásico aquoso. *Ciência e Tecnol Aliment* [Internet]. 2011;31(1):16–22.
15. Dobrev G, Zhekova B, Dobрева V, Strinska H, Doykina P, Krastanov A. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2015;4(1):77–82.
 16. Geoffry K, Achur RN. Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2018;14(November 2017):241–53.
 17. Mhetras NC, Bastawde KB, Gokhale D V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresour Technol*. 2009;100(3):1486–90.
 18. Webster J, Weber RWS. *Introduction fungi*. Third. New York: Cambridge University Press; 2007.
 19. Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, et al. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Stud Mycol*. 2016;85:199–213.
 20. Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and similarities amongst pathogenic *Aspergillus* species. In: Pasqualotto AC, editor. *Aspergillosis: From diagnosis to prevention*. Springer Science+Business Media B.V. 2010; 2010. p. 1–1027.
 21. Jain R, Naik SN. Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. *Biocatal Agric Biotechnol* [Internet]. 2018;15:181–4.

22. Falony G, Armas JC, Mendoza JCD, Hernández JLM. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation. *Food Technol Biotechnol*. 2006;44(2):235–40.
23. Gomes NB, Dias KB, Teixeira MFN, Santos CCA do A, Almeida AF de. Medium composition and Amazonian oils for lipase production by *Candida viswanathii*. *Acta Sci Technol [Internet]*. 2018;40(1):35088.
24. Jia J, Yang X, Wu Z, Zhang Q, Lin Z, Guo H, et al. Optimization of fermentation medium for extracellular lipase production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–8.
25. Lima VMG, Krieger N, Sarquis MIM, Mitchell DA, Ramos LP, Fontana JD. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol*. 2003;41(2):105–10.
26. Colla LM, Ficanha AMM, Rizzardi J, Bertolin TE, Reinehr CO, Costa JAV. Production and characterization of lipases by two new isolates of *Aspergillus* through solid-state and submerged fermentation. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–9.
27. Gupta P, Gupta N, Rai V, Parkhey P. Study of effect of nutritional factors for optimization of lipase production by lipolytic fungi. 2015;5(3):273–84.
28. Sotiropoulou EI, Varelas V, Liouni M, Nerantzis ET. Grape seed oil: from a winery waste to a value added cosmetic product - A review. *Edible Med Non-Medicinal Plants [Internet]*. 2012;2(May):867–78.

29. Manna L, Bugnone CA, Banchemo M. Valorization of hazelnut, coffee and grape wastes through supercritical fluid extraction of triglycerides and polyphenols. *J Supercrit Fluids* [Internet]. 2015;104:204–11.
30. Colla LM, Primaz AL, Benedetti S, Loss RA, de Lima M, Reinehr CO, et al. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47(2):461–7.
31. Costa-Silva TA, Souza CRF, Oliveira WP, Said S. Characterization and spray drying of lipase produced by the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. *Brazilian J Chem Eng*. 2014;31(4):849–58.
32. Niaz M, Iftikhar T, Qureshi FF, Niaz M. Extracellular lipase production by *Aspergillus nidulans* (MBL-S-6) under submerged fermentation. *Int J Agric Biol*. 2014;16(September):536–42.
33. Das A, Shivakumar S, Bhattacharya S, Shakya S, Swathi SS. Purification and characterization of a surfactant-compatible lipase from *Aspergillus tamaris* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. *3 Biotech*. 2016;6(2):131.
34. Shabbir A, Mukhtar H. Optimization process for enhanced extracellular lipases production from a new isolate of *Aspergillus terreus* ah-F2. *Pakistan J Bot*. 2018;50(4):1571–8.
35. Dell F, Facchini A, Vici AC, Pereira MG, Atilio J, Polizeli MDLTM, et al. Enhanced lipase production of *Fusarium verticillioides* by using response surface methodology and wastewater pretreatment application. 2016;6(2015):996–1002.

36. De Moraes WG, Kamimura ES, Ribeiro EJ, Pessela BC, Cardoso VL, De Resende MM. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. *Protein Expr Purif* [Internet]. 2016;123:26–34.
37. Wolski E, Menusi E, Remonato D, Vardanega R, Arbter F, Rigo E, et al. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. *LWT - Food Sci Technol*. 2009;42(9):1557–60.
38. Aguiéiras ECG, de Barros DSN, Fernandez-Lafuente R, Freire DMG. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. *Renew Energy*. 2019;130:574–81.
39. Biofuels. In 2016 [cited 2018 Sep 4]. p. 1–12.
40. Coelho JP, Filipe RM, Robalo MP, Stateva RP. Recovering value from organic waste materials: Supercritical fluid extraction of oil from industrial grape seeds. *J Supercrit Fluids*. 2018;
41. Dwyer K, Hosseinian F, Rod M. The market potential of grape waste alternatives. *J Food Res* [Internet]. 2014;3(2):91.
42. Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G. Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem*. 2008;108(3):1122–32.
43. Osuna Y, Sandoval J, Saade H, López RG, Martínez JL, Colunga EM,

- et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015;38(8):1437–45.
44. Xie W, Zang X. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- γ -Fe₂O₃nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. *Food Chem [Internet]*. 2017;227:397–403.
 45. Ferreira IM, de S. Ganzeli L, Rosset IG, Yoshioka SA, Porto ALM. Ethylic biodiesel production using lipase immobilized in silk fibroin-alginate spheres by encapsulation. *Catal Letters.* 2017;147(1):269–80.
 46. Zubiolo C, Santos RCA, Carvalho NB, Soares CMF, Lima AS, De Aquino Santana LCL. Encapsulation in a sol-gel matrix of lipase from *Aspergillus niger* obtained by bioconversion of a novel agricultural residue. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2014;37(9):1781–8.
 47. Zanin GM, Moraes FF. Enzimas Imobilizadas. In: SAID S, PIETRO RCLR, editors. *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa; 2004. p. 35–85.
 48. Stoytcheva M, Montero G, Gochev V, Valdez B. The immobilized lipases in biodiesel production. *Biodiesel - Qual Emiss By-Products [Internet]*. 2011;15.
 49. Jegannathan KR, Jun-yee L, Chan E, Ravindra P. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in j - carrageenan. *Fuel [Internet]*. 2010;89(9):2272–7.
 50. Won K, Kim S, Kim KJ, Park HW, Moon SJ. Optimization of lipase

- entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem.* 2005;40(6):2149–54.
51. Yücel Y, Demir C, Dizge N, Keskinler B. Lipase immobilization and production of fatty acid methyl esters from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy.* 2011;
 52. Lee DH, Park CH, Yeo JM, Kim SW. Lipase immobilization on silica gel using a cross-linking method. *J Ind Eng Chem.* 2006;12(5):777–82.
 53. Zou B, Hu Y, Yu D, Xia J, Tang S, Liu W, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase onto ionic liquid modified mesoporous silica SBA-15. *Biochem Eng J.* 2010;53(1):150–3.
 54. Almeida AF de, Terrasan CRF, Terrone CC, Tauk-Tornisielo SM, Carmona EC. Biochemical properties of free and immobilized *Candida viswanathii* lipase on octyl-agarose support: Hydrolysis of triacylglycerol and soy lecithin. *Process Biochem* [Internet]. 2018;65(May):71–80.
 55. Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernández-Lorente G, Guisán JM. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids.* 1998;93(1–2):185–97.
 56. Liu DM, Chen J, Shi YP. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC - Trends Anal Chem* [Internet]. 2018;102:332–42.
 57. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol*

- Equip [Internet]. 2015;29(2):205–20.
58. Palomo JM, Muoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzym*. 2002;19(20):279–86.
 59. Abreu Silveira E, Moreno-Perez S, Basso A, Serban S, Pestana Mamede R, Tardioli PW, et al. Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the Ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. *BMC Biotechnol*. 2017;17(1):1–13.
 60. Miletić N, Nastasović A, Loos K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresour Technol*. 2012;115:126–35.
 61. Volpato G, Filice M, Ayub MAZ, Guisan JM, Palomo JM. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J Chromatogr A*. 2010;1217(4):473–8.
 62. Fernández-Lorente G, Ortiz C, Segura RL, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Palomo JM. Purification of different lipases from *Aspergillus niger* by using a highly selective adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng*. 2005;92(6):773–9.
 63. Dalla-Vecchia R, Nascimento MDG, Soldi V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quim Nova*. 2004;27(4):623–30.
 64. Krishna SH, Karanth NG. Response Surface Modeling of Lipase –

- Catalyzed isoamyl propionate synthesis. *J Food Sci.* 2002;67(1):32–6.
65. Dhake KP, Thakare DD, Bhanage BM. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Fragr J.* 2013;28(2):71–83.
 66. Food flavors market by type (chocolate & browns, vanilla, fruits & nuts, dairy, spices), application (beverages, dairy, confectionery, bakery, meat, savory & snacks), origin (natural and artificial), form, and region - Global Forecast to 2023 [Internet]. *Markets and Markets.* 2018 [cited 2018 Sep 2].
 67. Garlapati VK, Banerjee R. Solvent-free synthesis of flavour esters through immobilized lipase mediated transesterification. *Enzyme Res.* 2013;2013.
 68. Radzi SM, Mustafa W a F, Othman SS, Noor HM. Green synthesis of butyl acetate, a pineapple flavour via lipase-catalyzed reaction. *Eng Technol.* 2011;132(11):7038–42.
 69. Bezbradica D, Crovic M, Tanaskovic S, Lukovic N, Carevic M, Milivojevic A, et al. Enzymatic syntheses of esters - green chemistry for valuable food, fuel and fine chemicals [Internet]. Vol. 21, *Current Organic Chemistry.* 2016;104-138.