
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

**IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE LIPASE
PRODUZIDA POR *Fusarium oxysporum* EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA**

BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Microbiologia
Aplicada.

Abril - 2012

547.758 Oliveira, Bruno Henrique de
O48i Imobilização e caracterização parcial de lipase produzida
 por *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa / Bruno
 Henrique de Oliveira. - Rio Claro : [s.n.], 2012
 132 f. : il., figs., tabs.

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Instituto de Biociências de Rio Claro
 Orientador: Valéria Marta Gomes de Lima

 1. Enzimas. 2. Lipase microbiana. 3. Celite® 545. 4.
 Delineamento fatorial. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE RIO CLARO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Produção e imobilização de lipase de *Fusarium oxysporum*

AUTOR: BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DE LIMA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras de Assis

Profa. Dra. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Instituto de Biociências, Unesp, Rio Claro/SP

Profa. Dra. ALESSANDRA MACHADO BARON
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Apucarana

Data da realização: 20 de abril de 2012.

*Dedico este trabalho aos meus pais e meu
irmão, pelo exemplo, amizade e o carinho.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Valéria Marta Gomes de Lima, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade de realizar esse trabalho e principalmente pela orientação e amizade.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Microbiologia Aplicada.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Sérgio Maluco, técnico do Laboratório de Biotecnologia Industrial, pelas ajudas nas ideias mirabolantes.

À Dr.^a. Derlene Attilis D'Angelis, pela identificação da cepa fúngica utilizada neste trabalho.

Aos amigos do LABI, pelo trabalho realizado em conjunto e pelos momentos de descontração. Principalmente ao Gilberto Coradi por me acompanhar na saga Assis-Rio Claro e na missão HPLC.

Aos amigos de Rio Claro, pela amizade rápida, pelas aulas e principalmente pelo teto que me acolhia.

Aos amigos que fiz em Thunder Bay/ON, durante o período que estive na Lakehead University. Principalmente ao Dr. Robert Frans Huibert Dekker e a Dr.^a Aneli de Melo Barbosa por terem me recebido em seu laboratório.

Aos meus amigos Alessandro M. Rosa, Silvia Rosa, Angélica R. Ferreira, André L. Ferreira, Leandro Mascareli, André Mascareli, Leonardo C. Cruz, entre outros, pelos momentos agradáveis e descontraídos que passamos e pelo apoio mesmo sem entender nada da minha pesquisa.

A Thaís Nascimento do Vale, que me acompanhou durante minha vida acadêmica com muita compreensão e carinho.

Ao meu pai Paulo de Oliveira, à minha mãe Célia Maria da Silva Oliveira e ao meu irmão Paulo Cesar de Oliveira pelo incentivo, amor e atenção dedicados em todos os momentos.

*"A descoberta consiste em ver o que todos
viram e em pensar no que ninguém pensou."*

Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt (1893-1986)

RESUMO

Dentre as principais enzimas utilizadas em biocatálise destacam-se as lipases, pois apresentam capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de micro-organismos são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las. A principal barreira à implantação de lipases em sistemas de biocatálise é seu custo elevado. A utilização de técnicas como método de planejamento fatorial e análise de superfície tem sido utilizadas para a otimização das condições de cultivo e catálise, visando aumento de atividade e redução de custos de fermentação. Outra estratégia importante tem sido o desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática, permitindo a recuperação e reutilização da enzima após a catálise. A adsorção é a abordagem de imobilização mais utilizada, devido à facilidade de uso e baixo custo. Este trabalho apresenta a otimização da produção de lipase pelo fungo filamentosso *Fusarium oxysporum*, utilizando delineamento fatorial (DCCR) e análise de superfície de resposta (MSR), a imobilização da enzima em diferentes suportes e a caracterização da lipase imobilizada. Inicialmente, foram estudados separadamente oito fontes de carbono e cinco fontes de nitrogênio. No DCCR foram avaliadas quatro variáveis na produção de lipase: concentração da fonte de carbono, concentração da fonte de nitrogênio, surfactante Triton X-100 e adição de extrato de levedura. Após o estudo de condições de cultivo, a enzima foi imobilizada em diferentes suportes: encapsulação em gel de polióxido de etileno (PEO) e alginato de cálcio e, adsorção em Celite[®] 545 e Octil Sepharose CL-4B. Neste trabalho também foi estudada a caracterização bioquímica parcial da enzima livre e imobilizada em Celite. Dentre as fontes de carbono estudadas, os óleos que proporcionaram os maiores valores de atividade lipolítica foram os de oliva (5,24 U/mL, 96h de cultivo) e frango (5,68 U/mL, 120h de cultivo). Obteve-se maior atividade em meio contendo sulfato de amônio em meio de Vogel (2,52 U/mL, 72 h de cultivo). A melhor condição de produção de lipase por *F. oxysporum* definida pelo DCCR foi 1,75% (v/v) de óleo de crambe, 0,5% (m/v) de sulfato de amônio, 0,5% (m/v) de Triton X-100 e 0,1% (m/v) de extrato de levedura, obtendo-se 2,77 U/mL, 25,18 U/mg e relação produção/custo de 4302 U/R\$. Verificou-se que a imobilização em Celite possui alto rendimento (150,9%) e em tempo reduzido, conferindo a enzima caráter protetor, aumentando a atividade e estabilidade frente a extremos de pH, altas temperaturas e presença de solventes orgânicos polares e apolares.

Palavras-chave: Lipase. *Fusarium oxysporum*. Imobilização. Celite[®] 545. Delineamento Fatorial.

ABSTRACT

Of the main enzymes used in biocatalysis lipases stand out, since they have the ability to catalyze reactions in both aqueous and in organic medium. From the economical and industrial point of view, lipases obtained from microorganisms are the most used due to their relative ease of production and the abundance of microorganisms capable of synthesizing them. The main barrier to implementation of lipases in biocatalysis systems is their high cost. The use of techniques such as method of factorial design and response surface methodology has been used for the optimization of culture conditions and catalysis, aiming to increase activity and reduce costs of fermentation. Another important strategy has been the development of techniques for immobilizing enzymes, allowing the recovery and reuse of the enzyme after catalysis. The adsorption is the approach most widely used for immobilization, due to ease of use and low cost. This work presents the optimization of lipase production by the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*, using central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM), the enzyme immobilization in different media and characterization of immobilized lipase. Initially were studied eight separate carbon sources and five nitrogen sources. In CCD four variables were evaluated in the production of lipase: carbon source concentration, nitrogen source concentration, surfactant Triton X-100 and yeast extract adding. After the study of the cultivation conditions, the enzyme was immobilized onto various matrix: encapsulation in polyethylene oxide (PEO) gel and calcium alginate, and adsorption on Celite[®] 545 and Octyl Sepharose CL-4B. This work also studied partial biochemical characterization of free and immobilized enzyme on Celite. Among the carbon sources studied, the oils that gave the highest values of lipase activity were olive (5.24 U/ml, 96 h of culture) and chicken (5.68 U/mL, 120 h of cultivation). Highest activity was obtained in medium containing ammonium sulfate in Vogel media (2.52 U/ml, 72 h of culture). The best conditions for lipase production by *F. oxysporum* defined by CCD was 1.75% (v/v) crambe oil, 0.5% (w/v) ammonium sulphate, 0.5% (w/v) Triton X-100 and 0.1% (w/v) yeast extract, yielding 2.77 U/mL, 25.18 U/mg and production/cost of 4302 U/R\$. It was found that the immobilization on Celite has a high yield (150.9%) and in a short time, the enzyme conferring protective character, increasing the activity and stability compared to extreme pH, high temperatures and the presence of polar and nonpolar organic solvents.

Keywords: Lipase. *Fusarium oxysporum*. Immobilization. Celite[®] 545. Factorial Design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1: Reação de hidrólise de um triacilglicerol catalisada por lipases, liberando glicerol e três ácidos graxos livres. A reação reversa também é possível, ou seja, a esterificação.	19
Figura 2: Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).	20
Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).	28
Figura I.1: Reação de hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila por lipases, com liberação de <i>p</i> -nitrofenol e ácido palmítico.	44
Figura I.2: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2 ² utilizando óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).....	47
Figura I.3: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) de atividade enzimática (U/mL) obtida por fermentação submersa de <i>Fusarium oxysporum</i> em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).	48
Figura I.4: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).	49
Figura I.5: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2 ² utilizando óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).....	51
Figura I.6: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).	52
Figura I.7: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) de atividade enzimática (U/mL) obtida por fermentação submersa de <i>Fusarium oxysporum</i> em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).....	52
Figura I.8: Relação entre valores observados e previstos para produção de biomassa (g/L).....	54
Figura I.9: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para produção de biomassa (g/L) por fermentação submersa de <i>Fusarium oxysporum</i> em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).....	55

Figura I.10: Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em diferentes fontes de carbono. **A)** Fontes de carbono com maior conteúdo de ácido oleico: (□) dendê, (△) frango e (○) oliva. **B)** fontes de carbono com menor conteúdo de ácido oleico: (■) milho, (●) soja, (▲) crambe, (▼) linhaça, (◀) oliva e (▶) glicerol. O óleo de oliva foi incluído nas duas figuras para comparação dos resultados. Condições de cultivo: 180 rpm, 28 °C. Atividade lipolítica determinada pela hidrólise do pNPP. 58

Figura I.11: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2⁴ utilizando gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4). 64

Figura I.12: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL). 65

Figura I.13: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/mL) em função de X2 e X3 (A) e (B), X2 e X4 (C) e (D) e X3 e X4 (E) e (F). X1: Gordura de frango; X2: Triton X-100; X3: Sulfato de amônio e X4: Extrato de levedura.....66

Figura I.14: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2⁴ utilizando óleo de crambe (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4). 70
Figura I.15: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL). 70

Figura I.16: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/mL) em função de X1 e X4 (A) e (B). X1: Óleo de crambe; X4: Extrato de levedura.....72

Figura II.1: Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico. 81

Figura II.2: Reutilização da lipase de *Fusarium oxysporum* imobilizada em PEO em reação de transesterificação. Condições de ensaio: 37 °C, 200 rpm, 15 min, 300 mg de filme.....83

Figura II.3: Influência da concentração de proteína imobilizada em PEO na atividade de transesterificação da lipase de *Fusarium oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, 200 rpm, 15 min, 300 mg de filme. 84

Figura II.4: Influência da temperatura de secagem dos filmes de PEO/enzima na atividade de transesterificação da lipase de *Fusarium oxysporum*. Condições de imobilização: 45mg de proteína. Condições de ensaio: 200 rpm, 15 min, 300 mg de enzima/suporte.....85

Figura II.5: Micrografia ótica de Celite® 545 em aumento de 1000x. A) Vista superior dos grânulos antes da imobilização. B) Vista lateral dos grânulos antes da imobilização. C) Vista superior dos grânulos após da imobilização. D) Vista lateral dos grânulos após imobilização. 87

Figura III.1: Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico. 96

Figura III.2: Capacidade de reutilização da lipase de *F. oxysporum* após imobilização. Condições de ensaio: 37 °C, pH 8,0. Atividade de 100% equivalente ao primeiro ciclo de atividade, 135 U/g. 97

Figura III.3: Efeito de extremos de pH na atividade lipolítica da lipase livre e imobilizada de *F. oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, leitura com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata. Para enzima livre o ponto de 100% equivale a 2,62 U/mL de extrato bruto concentrado, enquanto para enzima imobilizada equivale a 60 U/g de suporte. A reação foi acompanhada no tempo de 2 minutos. 98

Figura III.4: Efeito de extremos de pH na estabilidade da lipase livre e imobilizada de *Fusarium oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, incubada durante 1 h em variados tampões. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para enzima livre e imobilizada sem pré-incubação em pH 8,0 foi considerado 100%, sendo equivalente a 17,9 U/mL de extrato e 98,17 U/g de suporte, respectivamente. 99

Figura III.5: Efeito da temperatura na atividade da lipase livre (■) e imobilizada (●) produzida por *F. oxysporum*. Condição de ensaio: temperatura entre 30 e 80 °C, pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 37 °C (100%). Equivalente a 17,92 U/mL e 98,17U/g para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. 100

Figura III.6: Efeito da temperatura na estabilidade da lipase livre e imobilizada produzida por *F. oxysporum*. Condição de ensaio: temperatura entre 37 e 80 °C, pH 8,0 por 1 h. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 37 °C sem pré-incubação (100%). Equivalente a 17,92 U/mL e 98,17U/g para a enzima livre e imobilizada, respectivamente. 101

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Lipases utilizadas para a produção de ésteres metílicos e etílicos.....	32
Tabela I.1: Matriz do DCCR 2 ² para estudo da influência da concentração de óleo de milho (X1) e tensoativo Tween 80 ou Triton X-100 (X2).....	41
Tabela I.2: Especificação dos níveis das variáveis utilizadas nos DCCR 2 ²	41
Tabela I.3: Especificação dos níveis das variáveis usadas no DCCR 2 ⁴ avaliando fonte de carbono (X1), Triton X-100 (X2), fonte de nitrogênio (X3) e extrato de levedura (X4).....	42
Tabela I.4: Matriz do DCCR 2 ⁴ para estudo da influência da concentração da fonte de carbono (X1), tensoativo Triton X-100 (X2), fonte de nitrogênio (X3) e extrato de levedura (X4) na fermentação do fungo <i>Fusarium oxysporum</i>	43
Tabela I.5: Matriz do DCCR 2 ² contendo três repetições do ponto central após 72 h de fermentação com <i>Fusarium oxysporum</i>	46
Tabela I.6: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> para o DCCR 2 ² com óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).	46
Tabela I.7: Análise de variância obtida para o DCCR 2 ² com óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).....	47
Tabela I.8: Matriz do DCCR 2 ² contendo três repetições do ponto central após 72 h de fermentação com <i>Fusarium oxysporum</i>	50
Tabela I.9: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> para o delineamento rotacional 2 ² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).....	50
Tabela I.10: Análise de variância obtida para atividade enzimática (U/mL) no DCCR 2 ² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).....	51
Tabela I.11: Estimativa dos efeitos para produção de biomassa (g/L) de <i>Fusarium oxysporum</i> para o delineamento rotacional 2 ² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).	53
Tabela I.12: Análise de variância obtida para produção de biomassa no DCCR 2 ² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).	54

Tabela I.13: Validação para melhor resultado do DCCR 2 ² com óleo de milho (1,79%. m/v) e Triton X-100 (1,79%, m/v).	55
Tabela I.14: Perfil de ácidos graxos de cadeia longa predominantes nos diferentes óleos vegetais utilizados como fonte de carbono.	57
Tabela I.15: Atividade lipolítica dos meios fermentativos contendo diferentes fontes de carbono em 48 h de cultivo.	59
Tabela I.16: Atividade lipolítica dos meios fermentativos contendo diferentes fontes de nitrogênio.....	60
Tabela I.17: Matriz do DCCR 2 ⁴ contendo quatro repetições do ponto central após 72 h de fermentação com <i>Fusarium oxysporum</i>	62
Tabela I.18: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> para o DCCR 2 ⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (X3) e extrato de levedura (X4).....	63
Tabela I.19: Análise de variância obtida para o DCCR 2 ⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).....	64
Tabela I.20: Validação para melhor resultado do DCCR 2 ⁴ com gordura de frango (1,5%, v/v), Triton X-100 (1,5, m/v), sulfato de amônio (0,45%, m/v) e extrato de levedura (0,1%, m/v).	67
Tabela I.21: Matriz do DCCR 2 ⁴ contendo quatro repetições do ponto central após 72 h de fermentação com <i>Fusarium oxysporum</i>	68
Tabela I.22: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> para o DCCR 2 ⁴ com óleo de crambe (X1), Triton X-100 (X2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (X3) e extrato de levedura (X4).....	69
Tabela I.23: Análise de variância obtida para o DCCR 2 ⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).....	71
Tabela I.24: Validação para melhor resultado do DCCR 2 ⁴ com óleo de crambe (1,75%; v/v), Triton X-100 (0,5%; m/v), sulfato de amônio (0,1%; m/v) e extrato de levedura (0,1%; m/v).	72
Tabela I.25: Lipase produzida pelo fungo <i>Fusarium oxysporum</i> em meio de fermentação sem complementação de sais de Vogel.	73
Tabela I.26: Atividade lipolítica e condições de cultivo de diferentes cepas de <i>Fusarium</i>	76

Tabela I.27: Estimativa de custos para a produção de lipase por <i>Fusarium oxysporum</i> em 72 h nos diversos meios de cultura estudados.	77
Tabela II.1: Obtenção da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> em fermentação submersa e concentração da enzima.	82
Tabela II.2: Relação entre lipase liofilizada e lipase imobilizada em PEO	82
Tabela II.3: Reutilização da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> imobilizada em Alginato de Cálcio em reação de hidrólise	86
Tabela II.4: Atividade da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> imobilizada em Celite em hidrólise e transesterificação do pNPP.....	88
Tabela II.5: Influência do tempo durante o procedimento de adsorção da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> em Celite.....	89
Tabela II.6: Influência da temperatura durante o procedimento de adsorção da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i> em Celite.....	90
Tabela II.7: Influência da concentração de proteína durante o procedimento de adsorção da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i>	90
Tabela III.1: Atividade lipolítica e atividade específica das enzimas livre e imobilizada.	97
Tabela III.2: Atividade residual em solventes orgânicos polares e apolares.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NC-IUBMB – *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology.*

E.C. – *Enzyme Commission.*

kDa – Quilodalton.

PSS – Polissulfonato de sódio.

PEO – Polióxido de etileno.

ANP – Agência Nacional do Petróleo.

DCC – Delineamento Composto Central.

DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional.

MSR – Metodologia de Superfície de Resposta.

PF – Planejamento Fatorial.

DF – Delineamento Fatorial.

LABI – Laboratório de Biotecnologia Industrial.

BRI – *Biorefining Research Institute.*

MEA – Extrato de Malte Ágar.

ANOVA – Análise de Variância.

rpm – Rotação por minuto.

pNPP – Palmitato de *p*-nitrofenila.

pNP – *p*-nitrofenol.

p-valor – Nível descritivo

Log P – Logaritmo do coeficiente de partição octanol/água.

SUMÁRIO

	Página
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
1.1. Definição e características das lipases	19
1.2. Fontes de lipase	22
1.3. Produção de lipases microbianas	24
1.3.1. Produção de lipases por <i>Fusarium</i> sp.	26
1.4. Imobilização de lipase	27
1.5. Aplicação industrial das lipases	29
1.6. Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	34
1.7. Planejamento fatorial	35
 CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE LIPASE POR <i>Fusarium oxysporum</i> EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZANDO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR) E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)	39
1. MATERIAL E MÉTODOS	39
1.1. Micro-organismo	39
1.2. Esterilização dos meios e equipamentos	39
1.3. Produção da enzima em fermentação submersa	40
1.3.1. Efeito da concentração de fonte de carbono e surfactantes	40
1.3.2. Efeito de diferentes fontes de carbono	41
1.3.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio	41
1.3.4. Otimização da produção da enzima em fermentação submersa utilizando a melhor fonte de carbono e nitrogênio de acordo com experimentos anteriores (1.3.2 e 1.3.3)	42
1.4. Métodos Analíticos	43
1.4.1. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de p-nitrofenila	43
1.4.2. Determinação de proteínas	44
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
2.1. Produção da enzima em fermentação submersa	44
2.1.1. Influência de tensoativos	44
2.1.1.1. Influência da concentração de Tween 80 e de óleo de milho	45

2.1.1.2. Influência da concentração de Triton X-100 e óleo de milho.	49
2.1.1.2.1. Considerações gerais.	55
2.1.2. Influência de diferentes fontes de carbono	56
2.1.3. Influência de diferentes fontes de nitrogênio	59
2.1.4. Otimização da produção da enzima em fermentação submersa utilizando as melhores fontes de carbono e nitrogênio	61
2.1.4.1. Primeiro planejamento experimental (gordura de frango)	61
2.1.4.2. Segundo planejamento experimental (óleo de crambe)	67
2.1.5. Influência dos sais de Vogel na produção da lipase de <i>Fusarium oxysporum</i>	72
2.1.6. Considerações gerais	74

CAPÍTULO II - IMOBILIZAÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO E ADSORÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA POR *Fusarium oxysporum* EM DIFERENTES SUPORTES

1. MATERIAL E MÉTODOS	78
1.1. Produção da enzima em fermentação submersa	78
1.2. Estudos de imobilização	78
1.2.1. Imobilização por encapsulação em filmes de polióxido de etileno (PEO)	78
1.2.2. Imobilização por encapsulação em alginato de cálcio	79
1.2.3. Imobilização por adsorção em Celite® 545	79
1.2.4. Imobilização por interação hidrofóbica em Octil-Sepharose CL-4B.	79
1.2.5. Avaliação da imobilização	80
1.3. Métodos analíticos	80
1.3.1. Atividade de transesterificação utilizando substrato sintético palmitato de p-nitrofenila.	80
1.3.2. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de p-nitrofenila	80
1.3.3. Determinação de proteínas	81
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
2.1. Estudos de imobilização	81
2.1.1. Imobilização por encapsulação em filmes de polióxido de etileno (PEO)	82
2.1.1.1. Efeito da concentração proteica	83

2.1.1.2. Efeito na atividade enzimática da temperatura de secagem do filme de PEO	84
2.1.2. Imobilização por encapsulamento em alginato de cálcio	85
2.1.3. Imobilização por adsorção em Celite® 545	86
2.1.3.1. Efeito do tempo de contato enzima/suporte	89
2.1.3.2. Influência da temperatura de incubação	89
2.1.3.3. Influência da concentração de proteínas	90
2.1.4. Imobilização por adsorção em Octil Sepharose CL-4B	91
2.1.4.1. Influência do tempo de contato enzima/suporte	91
2.1.4.2. Influência da concentração de proteínas	91
2.1.5. Considerações gerais	92
CAPÍTULO III - COMPARAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS ENTRE LIPASE DE <i>Fusarium oxysporum</i> LIVRE E IMOBILIZADA EM CELITE.	93
1. MATERIAL E MÉTODOS	93
1.1. Micro-organismo	93
1.2. Esterilização dos meios e equipamentos	93
1.3. Produção da enzima em fermentação submersa	93
1.4. Imobilização da enzima	94
1.5. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada	94
1.5.1. Influência do pH na atividade e estabilidade	94
1.5.2. Influência da temperatura na atividade e estabilidade	95
1.5.3. Estabilidade em solventes orgânicos	95
1.6. Métodos analíticos	96
1.6.1. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de <i>p</i> -nitrofenila	96
1.6.2. Determinação de proteínas	96
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
2.1. Mensuração da atividade enzimática	97
2.2. Atividade e estabilidade frente a extremos de pH	98
2.3. Atividade e estabilidade frente a diferentes temperaturas	99
2.4. Estabilidade a solventes orgânicos polares e apolares	101
2.5. Considerações gerais	103
CONCLUSÕES	105

Conclusão Geral do Trabalho	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

água no meio é substituída por outros agentes nucleofílicos, como álcoois, aminas ou ácidos, outras reações como esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise podem ocorrer (JAEGER e EGGERT, 2002; BRANCO, 2008) (Figura 2).

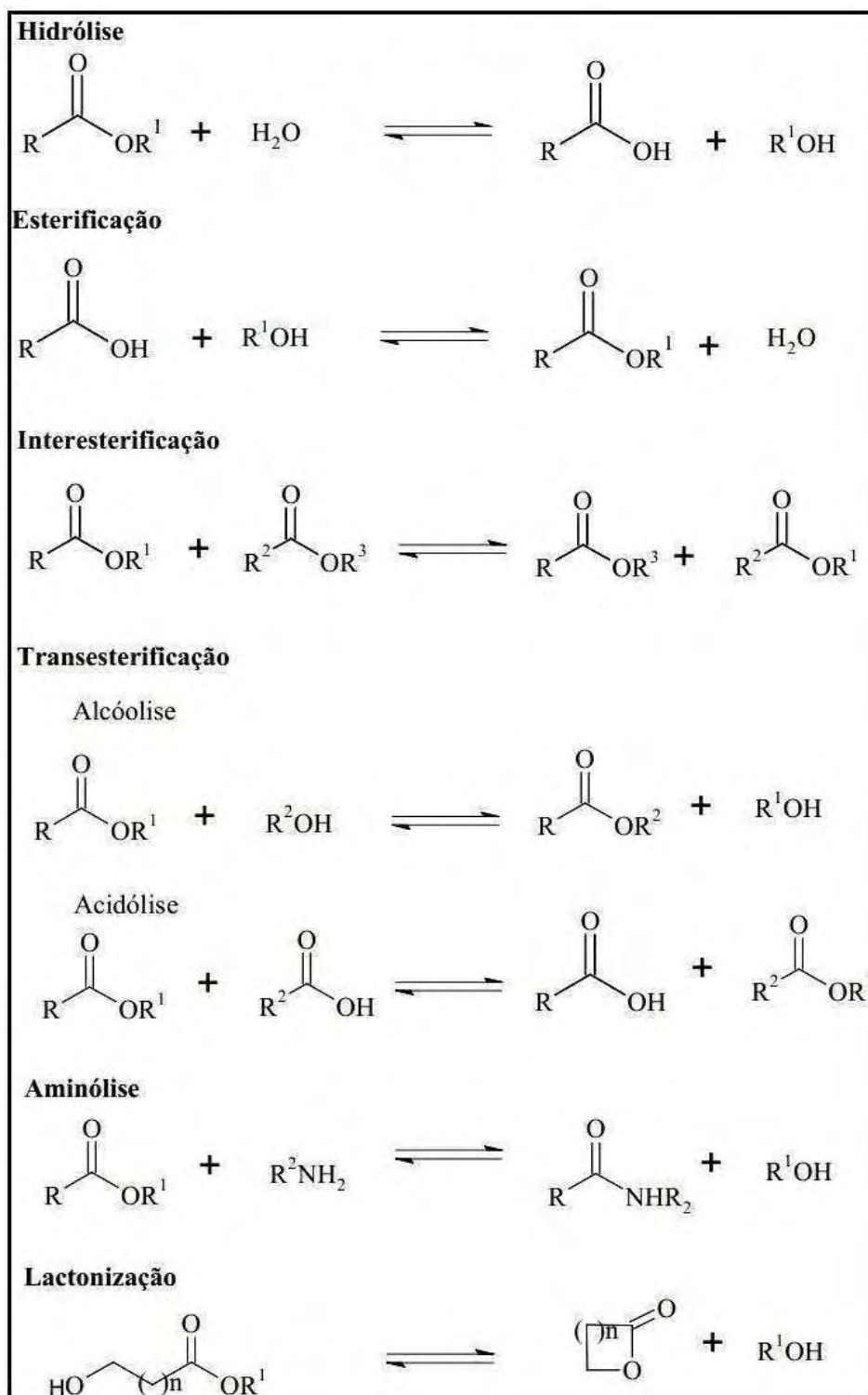


Figura 2: Reações catalisadas por lipases. Adaptado de Paques e Macedo (2006).

A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa entre 30 e 40 °C e embora suas características de termoestabilidade variem consideravelmente em função da origem, as enzimas de origem microbiana são, em geral, as mais estáveis. Usualmente, não necessitam de cofatores e são ativas em uma ampla faixa de pH, apresentando uma alta atividade na faixa de pH entre 5 e 9, com um máximo situado entre 6 e 8 (FREIRE e CASTILHO, 2000).

São enzimas que apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (PANDEY et al., 1999). A versatilidade destas enzimas sugere que sua cadeia polipeptídica seja flexível e possa adotar diferentes conformações dependendo das características físico-químicas do meio, o que dificulta a modelagem e previsão de interações estereoquímicas enzima-substrato (COSTA e AMORIN, 1999). Os sítios catalíticos das lipases são formados por uma serina, uma histidina e um resíduo ácido (aspártico ou glutâmico), compondo a denominada tríade catalítica (BRADY et al. 1990).

O centro ativo das lipases fica oculto por uma “tampa” (“lid”) polipeptídica na forma nativa da enzima, isto o faz ficar inacessível às moléculas de substrato isoladas em meio aquoso. A enzima torna-se ativa apenas quando entra em contato com uma interface hidrofóbica, havendo, então, a abertura dessa “tampa”. Essa abertura consiste na reestruturação conformacional da lipase que cria uma região eletrofílica (“cavidade do oxiânion”) em torno do resíduo serina: a tampa helicoidal vira-se para trás encobrindo seu lado hidrofílico em uma cavidade polar, antes preenchida por moléculas de água, e expondo totalmente o lado hidrofóbico da “tampa”. Essa exposição faz com que a superfície apolar em torno do sítio catalítico seja expandida. A cavidade do oxiânion é uma região na estrutura proteica capaz de acomodar o estado de transição tetraédrico, além de ser responsável pela estabilização de cargas negativas geradas durante o ataque nucleofílico na ligação carbonila do substrato (BALCÃO, PAIVA e MALCATA, 1996; PAIVA, BALCÃO e MALCATA, 2000).

A diferenciação entre lipases e esterases tem sido feita pela diferença de especificidade das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (BROCKMAN, 1984;

SALAMEH e WIEGEL, 2007). Deve-se enfatizar, entretanto, que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999).

A especificidade de lipases pode se expressar quanto ao tipo de reação, de substrato ou por fatores que afetam a ligação enzima-substrato. Há vários tipos de especificidade encontrados: a) quanto ao substrato: diferentes velocidades de hidrólise entre triacilgliceróis, diacilgliceróis ou monoacilgliceróis catalisadas por uma mesma enzima ou enzimas purificadas de uma mesma fonte; b) posicional ou regioseletividade: hidrólise preferencial de ésteres primários, secundários, terciários ou hidrólise não específica, liberando ácidos graxos das três posições; c) quanto aos ácidos graxos que compõem o substrato ou tiposseletividade: preferência por ácidos graxos específicos, principalmente quanto ao comprimento da cadeia e número de insaturações; d) estereoespecificidade: discriminação entre enantiômeros, no caso de substratos racêmicos. Pode-se observar também a combinação dos tipos citados ou a ausência de especificidade (CASTRO et al., 2004; PAQUES e MACEDO, 2006).

A importância das lipases é observada pelo grande número de artigos publicados recentemente. De fato, ao longo dos últimos anos, tem havido um aumento progressivo no número de publicações relacionadas com aplicações industriais de lipases, reações de catálise realizadas em solventes orgânicos comuns, líquidos iônicos, ou mesmo em solventes não convencionais (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

1.2. Fontes de lipase

As lipases são naturalmente encontradas em tecidos de animais, principalmente no pâncreas, em plantas como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), e em micro-organismos como fungos filamentosos, leveduras e bactérias, sendo os gêneros *Rhizopus*, *Candida* e *Pseudomonas* considerados as principais fontes produtoras desta enzima (JAEGER et al., 1999; PANDEY et al., 1999). Devido às suas diversas fontes produtoras cada lipase apresenta propriedades e características únicas (SAXENA et al., 2003).

Há pouco mais de cem anos, o microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (JAEGER e

EGGERT, 2002). Então, a partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando diversos micro-organismos. Particularmente, as enzimas microbianas são mais estáveis que as extraídas por plantas e animais, tornando sua produção mais conveniente e segura. Hoje se conhece um grande número de micro-organismos produtores de lipases (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de micro-organismos são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de micro-organismos capazes de sintetizá-las. Os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (*Generally Regarded as Safe*, JAEGER et al., 1994). Algumas das lipases mais importantes comercialmente são produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, e *Rhizomucor*. Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (*Amano Europe Enzyme Ltd.*, UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral.

A produção de lipase por fungos filamentosos varia de acordo com a cepa, a composição do meio de crescimento, as condições de cultura, o pH, temperatura, e fonte de carbono e nitrogênio (CIHANGIR e SARIKAYA, 2004). Em condições apropriadas de cultivo algumas espécies de fungos filamentosos produzem quantidades consideráveis de lipase, sendo estas separadas do meio de cultivo e da massa micelial por simples filtração e centrifugação. Apenas pequenas quantidades de lipases têm sido encontradas dentro ou aderidas ao micélio fúngico (SALLEH et al., 1993; RAPP, 1995). Os fungos filamentosos são reconhecidamente as melhores fontes produtoras de lipases, com várias patentes requeridas, sendo amplamente estudadas do ponto de vista genético e bioquímico. Porém, apesar do grande número de lipases descritas na literatura, somente enzimas de poucas espécies tem demonstrado possuir a estabilidade adequada e capacidade de biocatálise

satisfatória para serem empregadas em reações de síntese nos laboratórios e assim, serem consideradas de relevância à aplicação industrial (BCC RESEARCH, 2011).

Apesar de todos os avanços obtidos atualmente, objetivando maximizar a síntese de lipases por meio de cepas microbianas já conhecidas, é fundamental também buscar ferramentas como melhoramento genético, tecnologia de DNA recombinante e análises genômicas, visando tornar estes micro-organismos apropriados para o uso comercial (BENNETT, 1998; FUNGARO e MACCHERONI Jr., 2002). No entanto, a seleção de cepas selvagens hiperprodutoras ainda é uma técnica de grande importância, sobretudo em países com grande biodiversidade como o Brasil (FREIRE e CASTILHO, 2000; LAMBAIS, 2009).

1.3. Produção de lipases microbianas

Lipases microbianas são na sua maioria extracelulares e sua produção é muito influenciada pela composição do meio, além de fatores físico-químicos tais como temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O fator mais importante para a produção de lipases tem sempre sido relatado como a fonte de carbono, uma vez que atuam como indutores. Estas enzimas são geralmente produzidas na presença de um lipídio, tais como óleo ou qualquer outro indutor, tal como triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres hidrolisáveis, tensoativos, sais biliares, e glicerol (SHARMA, CHISTI e BANERJEE, 2001; GUPTA, GUPTA, e RATHI, 2004).

Fontes de nitrogênio, tanto orgânicas quanto inorgânicas, e micronutrientes essenciais, também devem ser cuidadosamente consideradas para o crescimento e produção da enzima (GHOSH et al., 1996). Estes requisitos nutricionais são fornecidos ao micro-organismo pela adição ao meio de cultivo de ureia, sulfato de amônio, nitrato de amônio, ou componentes complexos, tais como extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte e peptona, além de resíduos agroindustriais como farelos de soja e trigo, casca de arroz, torta de mamona, milhocina, entre outros (TREICHEL et al., 2010).

A produção de alta atividade enzimática durante o cultivo do micro-organismo é imperativo para a aplicação industrial de lipases. No entanto, poucos esforços têm sido realizados para melhorar o processo de fermentação através de pesquisa da

variação dos componentes do meio e das interações internas durante o processo de cultivo (SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

Lipases microbianas são produzidas por fermentação submersa (CHAKRABORTY e PAULRAJ, 2008) e fermentação em estado sólido (ALKAN et al., 2007). A produção de lipase é raramente constitutiva e, por isto, indutores como óleos vegetais (KUMAR et al., 2005), Tween 20/80 (LI, CHENG e CHEN, 2004), hexadecano (BOEKEMA et al., 2007) e triacilgliceróis sintéticos como tributirina e tripalmitina são utilizados (RAHMAN et al., 2006). Elevadas concentrações de ácido graxo livre ou óleo vegetal podem reprimir a síntese de lipase. Fontes de nitrogênio possuem efeito variado na produção de lipase e fontes orgânicas como peptona e extrato de levedura foram relacionados a aumento da produção dessa enzima (GUNASEKARAN, KOTAY e DAS, 2006). Ainda assim, de acordo com a cepa produtora, é possível substituir a fonte orgânica complexa por sais inorgânicos como sulfato de amônio (LIMA et al., 2004) e nitrato de sódio (DIMITRIJEVIĆ et al., 2011).

A presença de surfactante também é um pré-requisito importante para a produção de lipase. A atividade catalítica das lipases é governada por ativação interfacial, uma propriedade observada quando o substrato lipídico forma uma emulsão, aumentando a interface para a enzima atuar. A adição de um surfactante diminui a tensão superficial entre a fase orgânica e aquosa na mistura de reação e aumenta a taxa de emulsificação (WU e TSAI, 2004). Os agentes tensoativos mais utilizados são Tween e Triton-X 100 (POGAKU et al., 2010).

Ao longo dos últimos anos, a seleção de substratos adequados para o processo de fermentação foi principalmente focada em resíduos agroindustriais. A utilização desses resíduos como substratos alternativos para a produção da enzima pode contribuir na redução ou eliminação de certos descartes industriais. Vargas et al. (2008) investigou a produção de lipases por *Penicillium simplicissimum* utilizando farelo de soja suplementado com óleo de soja, água de maceração de milho ou levedura hidrolisada. A farinha de soja sem suplementos proporcionou o melhor resultado. Alkan et al. (2007) estudaram o efeito de vários resíduos agroindustriais (farelo de trigo, casca de arroz, casca de lentilha, resíduos de banana, melancia e melão) na produção de lipase usando *Bacillus coagulans*. Os melhores resultados foram obtidos utilizando os resíduos sólidos a partir de melão suplementado com NH_4NO_3 e 1% de óleo de oliva.

1.3.1. Produção de lipases por *Fusarium* sp.

Os fungos do gênero *Fusarium* sp. são de ampla distribuição geográfica, tendo espécies cosmopolitas e outras com ocorrência restrita a determinados ambientes, ocorrendo, predominantemente, nas regiões tropicais e subtropicais ou em condições de clima frio das regiões temperadas (BURGESS et al., 1994). No Brasil as espécies de *Fusarium* sp., identificadas entre 1993 e 1996, são principalmente de importância fitopatológica.

Trabalhos têm demonstrado a capacidade de síntese de várias enzimas por *Fusarium*, como por exemplo, cutinases (MANNESSE et al., 1995), xilanases e celulasas (PANAGIOTOU et al., 2003) e enzimas fibrinolíticas (TAO et al., 1997; TAO et al., 1998).

Hoshino et al. (1992) reportaram a produção de lipase por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* em meio mínimo para *Fusarium*, relatando atividade de 10 U/mL. Shimada et al. (1993) isolaram do solo uma cepa de *F. heterosporum* produtora de uma lipase solvente-tolerante. A atividade obtida foi de 62700 U (método titulométrico) após 65 h de fermentação em meio contendo 3% de óleo de soja. Rapp (1995), cultivando *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, obteve 35,3 U/mL de atividade enzimática (método titulométrico) após 140 h de cultivo em meio Basal (BM) suplementado com 1% (m/v) de óleo de oliva. Maia et al. (1999) conseguiram, após 72 h de fermentação, 10500 U/L de lipase (método titulométrico) produzida por *F. solani* em meio contendo 3% (p/v) de peptona e 0,5% (v/v) de óleo de oliva. Posteriormente, Maia et al. (2001), utilizando *F. solani*, obtiveram 0,88 U/mL de atividade enzimática em meio contendo 0,5% (v/v) de óleo de gergelim. Quando o meio foi suplementado com elementos traços, a produção aumentou para 2,5 U/mL.

Nagao et al. (2002) conseguiram aumentar a termoestabilidade da lipase produzida por *F. heterosporum* ao inserir o gene responsável pela produção da enzima na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Camargo-de-Morais et al. (2003) obtiveram 170 U/L de atividade enzimática após 72 h de cultivo de *F. oxysporum* em meio Nitrato (NM) adicionando 1% (v/v) de trioleína como indutor. Prazeres, Cruz e Pastore (2006), cultivando *F. oxysporum*, obtiveram 735 U/mL de atividade enzimática (método titulométrico) após 48 h de cultivo em meio contendo 1% (m/v) de óleo de oliva. Rifaat et al. (2010), utilizando *F. oxysporum*, obtiveram 17,0 U/mL de atividade lipolítica em meio contendo 1,0% (v/v) de óleo de oliva.

Apesar dos estudos sobre lipases de *Fusarium* não serem tão vastos e abrangentes, alguns artigos relatam as características interessantes das lipases produzidas por estes micro-organismos, especialmente sua estabilidade em solventes orgânicos como etanol, acetona e n-propanol (SHIMADA et al., 1993; NAGAO et al., 1993; RAPP et al., 1995; CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003). Os dados de estabilidade em solventes orgânicos tornam promissora a ideia de que a enzima pode ser aplicada com sucesso em reações de transesterificação na presença destes solventes. Em trabalho recente, Arai et al. (2010) tiveram bons resultados na produção de biodiesel utilizando uma mistura de lipases contendo a enzima produzida por *F. heterosporum*. Hama et al. (2008) demonstraram a possibilidade de produção de biodiesel via transesterificação enzimática utilizando células imobilizadas de *Aspergillus oryzae* que expressavam o gene para produção de lipase de *F. heterosporum*.

Embora existam estudos sobre as fontes de carbono e lipídios indutores da produção da lipase por fungos do gênero *Fusarium* (RAPP, 1995; MAIA et al., 1999; CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003; RIFAAT et al., 2010), não há estudos sobre sua melhor concentração nem interação com outros componentes do meio de cultura, como fonte de nitrogênio e presença de tensoativos. Sendo assim, estudos aprofundados do cultivo de fungos desse gênero para produção de lipases são ainda inéditos.

1.4. Imobilização de lipase

Em reações químicas e bioquímicas, o uso de enzimas puras pode ser dispendioso e seu descarte após o uso é economicamente inviável. Além disso, a recuperação do meio reacional pode ser difícil (FABER, 1997). O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (SOARES et al., 1999).

As técnicas mais utilizadas de imobilização incluem adsorção física em suporte sólido, ligação covalente a um suporte sólido e encapsulamento físico dentro de um suporte de matriz polimérica (Figura 3).

O procedimento de adsorção de uma proteína é muito simples e é um dos métodos mais utilizados. A enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações

de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. Vários materiais podem ser utilizados, tais como polietileno, polipropileno, sílica, celite, Octil-Sepharose, celulose, Sephadex, entre outros (VILLENEUVE et al., 2000).

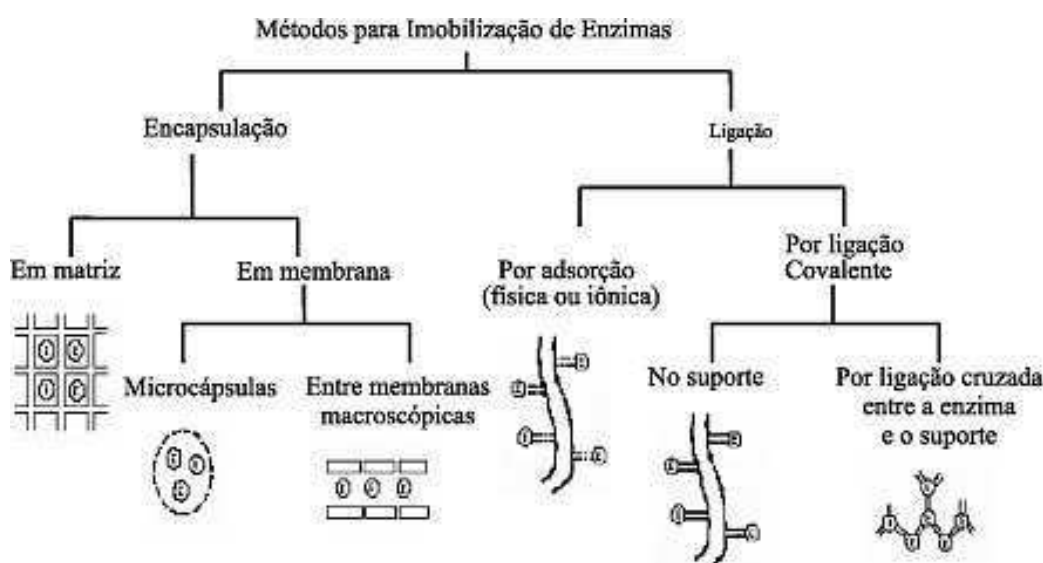


Figura 3: Métodos de imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A fixação de enzimas no interior de poros de suportes sólidos proporciona proteção da estrutura proteica com relação à desnaturação pelo contato com solventes orgânicos ou a ação de bolhas de gases e forte agitação, além de prevenir agregação (YU, WU e CHING, 2004; MATEO et al., 2007)

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulação consiste em "confinar" uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula. A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos, se difundem (DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004). A vantagem da utilização desta técnica é

que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de minimizar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (VILLENEUVE et al., 2000).

Filmes de polissulfonato de sódio (PSS), alginato de cálcio, polióxido de etileno (PEO) e blendas PSS/PEO com diversas composições foram utilizados para a imobilização de lipases de diferentes fontes e procedências. Estes sistemas foram usados como catalisadores na esterificação do ácido láurico com n-pentanol, em hexano. Os métodos de confinamento e microencapsulação de enzimas na catálise de diferentes reações têm sido mostrados por vários autores (LEE, POPPENBORG e STUKEY, 1998; VILLENEUVE et al., 2000; BETIGERI e NEAU, 2002).

1.5. Aplicação industrial das lipases

Pela capacidade de catalisar diversas reações e com possibilidade de diferentes especificidades de substratos, as lipases apresentam um enorme potencial de aplicações, e representam cerca de 20% das enzimas utilizadas nos processos de biotransformação (MOURA et al., 2007). São biocatalisadores que possuem muitas aplicações, razão pela qual a sua participação no mercado mundial de enzimas industriais cresce significativamente. Estima-se que, no futuro, elas terão importância industrial comparável à das peptidases, as quais representam de 25 a 40% das vendas de enzimas industriais (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

Recentemente, o interesse em pesquisas com lipases, principalmente de origem microbiana, tem crescido devido ao seu grande potencial biotecnológico. Como biocatalisadores, as lipases apresentam algumas vantagens importantes sobre os catalisadores clássicos industriais. Efetivamente, suas características de especificidade, regiosseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos requerem procedimentos mais fáceis e baratos, que utilizam temperatura e pressão ambientes,

condições que minimizam a degradação de compostos lábeis e evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluente (VILLENEUVE et al., 2000, CASTRO-OCHOA et al., 2005, SILVA et al., 2005). A especificidade das lipases é um fator decisivo para a sua aplicação analítica ou industrial, o que atrai uma considerável atenção ao uso dessas enzimas.

O uso de lipases como aditivos em detergentes (biosurfactantes) ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas, chegando a 32% do mercado. Isso se deve ao fato de que a enzima não necessita de um alto grau de pureza nem de especificidade, o que resulta em enzimas de menor custo de produção. Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases tem sido explorada em vários outros campos de atividade, como por exemplo, na resolução de misturas racêmicas; no tratamento de efluentes, na bioconversão de óleos e gorduras (transesterificação) para a produção de biodiesel; na indústria agroquímica; na manufatura do couro e papel; na nutrição; na produção de aromas; na formulação de perfumes, fragrâncias e cosméticos; na fabricação de plásticos e fibras sintéticas; na síntese de sedativos e outros fármacos; dentre outras (JAEGER e EGGERT, 2002; KIRK, BORCHERT e FUGLSANG, 2002; ZHANG et al., 2002; EN-SHYH e HUI-CHING, 2005; SALIS et al., 2005; SILVA et al., 2005; CAMMAROTA e FREIRE, 2006; HASSAN et al., 2006; WILKINSON e BACHMANN, 2006).

As lipases são as enzimas de escolha para processamento de óleos e gorduras. A posição e o grau de insaturações e o tamanho da cadeia influenciam não somente nas propriedades físico-químicas de um dado triglicerídeo, mas também no seu valor nutricional e sensorial. Lipases têm sido utilizadas para hidrólise seletiva de ácidos graxos, seguida da síntese de novas ligações éster, construindo assim triacilgliceróis com características distintas das originais e de interesse para um dado alimento. Assim, pela ação de uma enzima lipolítica, um triacilglicerol que inicialmente constituía-se, por exemplo, dos ácidos palmítico-oléico-esteárico, pode tornar-se esteárico-oléico-esteárico, com modificação das propriedades funcionais do produto (JAEGER e REETZ, 1998, PANDEY et al., 1999).

Atualmente, existe grande interesse no uso de lipases no processo de transesterificação enzimática, pois o processo ocorre em condições brandas (temperatura ambiente e pH neutro), evitando os problemas que acompanham a

catálise ácida ou básica. Além disso, o glicerol é obtido com alto grau de pureza e facilmente recuperável, a purificação do éster metílico é simples e não há geração de subprodutos que necessitem de tratamento. Um grande número de artigos mostra que lipases podem ser interessantes como catalisadores na síntese de biodiesel (KAIEDA et al., 1999; MOREIRA et al., 2007; UM, XIAU e ZHANG, 2008; CHEN, DU e LIU, 2008).

Os ésteres metílicos de ácido graxo, ou biodiesel, são fortes candidatos para substituir o diesel de petróleo já que suas características são semelhantes, não são derivados do petróleo e sim de fontes renováveis, são biodegradáveis e, em relação ao diesel convencional, possuem produtos de combustão com níveis reduzidos de poluentes. O biodiesel pode ser usado na sua forma pura ou misturado ao diesel, em motores convencionais sem qualquer modificação (AL-ZUHAIR et al., 2006). O governo brasileiro criou, através do Ministério da Ciência e Tecnologia, o Programa Brasileiro PROBIODIESEL, regulamentado pela Portaria MCT 702 de 30 de outubro de 2002. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil passou a conter 5% de biodiesel (B5). No pódio mundial desse biocombustível, o Brasil se destacou em 2010 como o segundo maior produtor com mais de 2,5 bilhões de litros e, em 2011, como o maior consumidor (ANP, 2011).

Uma ampla gama de lipases tem sido utilizada em reações de transesterificação e esterificação. A tabela 1 apresenta uma visão geral dos resultados mais promissores para a produção de biodiesel.

Tabela 1: Lipases utilizadas para a produção de ésteres metílicos e etílicos.

Lipase	Óleo/gordura	Álcool	Conversão (%)	Referência
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de soja	Metanol	90	Kaieda et al. (2001)
<i>Burkholderia cepacia</i>			>80	
<i>Candida rugosa</i>			90	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol	Metanol	>95	Soumanou and Bornscheuer (2003)
<i>Rhizomucor miehei</i>			>80	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>			>60	Deng et al. (2005)
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de girassol	Metanol	93,2	
<i>Rhizomucor miehei</i>		Etanol	79,1	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>		1-Propanol	89,8	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>		2-Propanol	72,8	
<i>Burkholderia cepacia</i>		1-Butanol	88,4	Paula et al. (2007)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Isobutanol	45,3	
Lipase pancreática de porco	Óleo de babaçu	Butanol	95	
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de pinhão manso	Etanol	98	Shah e Gupta (2007)
<i>Candida antarctica</i>	Sebo bovino	Metanol	74	Lee, Foglia e Chang (2002)
<i>Candida</i> sp.	Óleo de fritura	Metanol	92	Tan, Nie e Wang (2006)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Óleo de girassol	Metanol	52	Rodrigues et al. (2008)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de pinhão manso	Etanol	93	Souza (2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			85	Liu et al. (2011)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de soja	Metanol	82	
<i>Rhizopus oryzae</i>	Óleo de pistache	Metanol	92	

Na indústria cosmética a utilização das enzimas vem se intensificando, não apenas na síntese de matérias-primas, mas também como ingredientes ativos nas formulações. Vários exemplos de síntese de fragrâncias utilizando lipase foram relatados, com (-)-mentol sendo o mais proeminente. Uma nova forma de isolar ésteres de (-)-mentol enantiomericamente puros é através de uma etapa de transesterificação com ($\pm$)-mentol usando lipase de *B. cepacia* (ATHAWALE, MANJREKAR e ATHAWALE, 2001). O produto final metacrilato de metila foi subsequentemente polimerizado para ser usado como um perfume de liberação sustentada. O jasmonato de metila é outro componente de perfumaria importante, que pode ser sintetizado com uma reação catalisada por lipase para produzir o intermediário quiral epicucurbato de metila (KIYOTA et al., 2001).

Centenas de toneladas de ésteres de cosméticos são produzidas todos os anos pela indústria de cosméticos. Sendo o miristato mirístico, ricinoleato cetílico e cocoato decílico os emolientes de ésteres mais populares na Europa (HOLM, 2007). No Brasil, além dos citados, também são comuns o palmitato de cetila, miristato de isopropila, oleato de octila, oleato de isobutila, estearato de octila, palmitato de octila, oleato de isodecila, entre outros (FORTINBRÁS). Estes ésteres de cosméticos são ésteres alquílicos que são utilizados em cremes e loções emulsionadas, cremes anidros (batons, blushes e pomadas) e demaquilantes.

Estes ésteres de cosméticos são produzidos por rotas químicas, porém, pela capacidade das lipases em agir em reações de síntese, estas também podem ser utilizadas para produção desses ésteres por via enzimática. Além da vantagem enantiosseletiva das lipases, ao comparar o impacto ambiental dos processos químico e enzimático, a biocatálise demonstra oferecer vantagens claras. Na empresa Degussa (Alemanha), líder mundial em especialidades químicas, o consumo de energia na produção de miristato mirístico foi reduzido em mais de 60%, e as emissões de diferentes poluentes, entre 60% e 90%, além de proporcionarem produto de qualidade superior, oferecendo conteúdo 2-17% maior de ingrediente ativo, menos subprodutos indesejáveis, melhor cor e odor (HOLSM, 2007). Unichem Internacional (Espanha) tem produção de palmitato de isopropila, miristato de isopropila e palmitato de octila para uso como um emoliente em produtos de cuidados pessoais tais como bronzeador, cremes e óleos de banho. A empresa afirma que a utilização da lipase no lugar do catalisador ácido convencional

melhora a qualidade do produto, com a necessidade mínima de refinação. Croda Universal Ltda. (Inglaterra) produz ésteres alquílicos com lipase de *Candida cylindracea* em biorreator. O custo global de produção é ligeiramente maior em comparação com o método convencional, mas com melhor qualidade do produto final (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006; SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012).

1.6. Crambe (*Crambe abyssinica*)

Originário da Etiópia, país africano de clima quente e seco, e domesticado na Europa, na região do Mediterrâneo, o crambe (*Crambe abyssinica*) pertence à família das crucíferas, a mesma da colza e da canola. Seus grãos oleaginosos contêm um óleo não comestível usado em produtos industriais. A planta é encontrada em áreas tropicais e subtropicais da África, no Oriente Médio, na Ásia Central e Ocidental, na Europa, nos Estados Unidos e na América do Sul.

O óleo de crambe é utilizado para fabricar uma infinidade de itens de consumo industrial nos países norte americanos, tais como lubrificantes, fluidos de transferência de calor, surfactantes, cosméticos, poliésteres, plásticos e nylons (*Economic Research Service*; GOLZ, 1993).

No início das pesquisas, durante os anos 90, foram analisadas as vantagens da planta como forrageira para a rotação de culturas e cobertura de solos no inverno. O grão, ainda pouco conhecido no Brasil, é mais uma matéria-prima para a geração de biodiesel, uma das grandes apostas do governo federal na oferta futura de combustíveis renováveis.

No Brasil seu cultivo iniciou em 1995, em Maracaju/MS, sendo o único país que estuda a viabilidade do cultivo voltado à produção de biodiesel (GUIRRA, 2009). A semente fornece até 38% de óleo e também alto teor de proteína (ECHEVENGUÁ, 2007; SOUZA et al., 2009). O óleo de crambe é menos susceptível à oxidação do que os óleos de soja e girassol, isso por que enquanto no óleo de crambe o ácido graxo predominante é o ácido erúico (58,5%), monoinsaturado (22:1), os óleos de soja e girassol contêm quantidades mais expressivas de ácidos graxos poli-insaturados, como o linoleico (18:2) e o linolênico (18:3) (VOSS, 2006; ECHEVENGUÁ, 2007).

À frente dos estudos de pouco mais de uma década sobre o crambe, a Fundação MS detém os direitos de comercialização das sementes da cultivar FMS

Brilhante. Segundo a instituição, o plantio apresenta produtividade que pode variar de 1.000 a 1.500 Kg por hectare e, do grão, o óleo corresponde de 36% a 38%. Além do rendimento em óleo, a cultura do crambe tem como vantagens: produção rápida, rusticidade, fácil adaptação do plantio e o custo baixo da atividade, que não exige novas máquinas e equipamentos, tem método simples de extração de óleo por meio de prensa ou extrusora, além de ser adequado para a agricultura familiar.

Estudos recentes comprovam a viabilidade do óleo de crambe para produção de biodiesel, porém estes são escassos (ANTHONISEN et al., 2007; SILVA et al., 2009; SOUZA et al., 2009), sendo ainda mais escassos os estudos de transesterificação enzimática dessa matéria prima (STEINKE, KIRCHHOFF e MUKHERJEE, 2000).

1.7. Planejamento fatorial

Atualmente, pelas necessidades da sociedade moderna, a pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações, sendo que para a devida exploração e o correto entendimento, a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (PEREIRA-FILHO, POPPI e ARRUDA, 2002).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. De acordo com Brasil et al. (2007), estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados.

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA, MORAIS e NAGATA, 2005). Além disso, muitos pesquisadores não contam com uma metodologia de planejamento experimental que seja ao mesmo tempo útil e simples, e estes em geral, apresentam dificuldades para escolher um modelo físico matemático que represente de maneira adequada os fenômenos que se deseja estudar.

De acordo com Atkinson e Donev (1992), os delineamentos compostos pertencem a uma família de delineamentos eficientes, os quais requerem poucos ensaios para sua realização.

Para Neto, Scarminio e Bruns (2003) e Montgomery (2005), o desenvolvimento de algumas pesquisas experimentais (trabalho de pouca ou nenhuma informação sobre o sistema em estudo até a otimização das variáveis do processo) pode ser alcançado através de sucessivas aplicações de técnicas específicas de estatística. Essas técnicas são: planejamento fatorial (PF), delineamento fatorial (DF), pelo arranjo quadrado, e da metodologia de superfície de resposta (MSR).

A escolha da melhor estratégia do planejamento experimental depende principalmente do número de variáveis independentes ou fatores que se deseja estudar e do conhecimento inicial que se tem sobre o processo. Quando o número de fatores é muito grande, é mais conveniente escolher um primeiro fatorial fracionado que reduz o número de ensaios. Desta forma, todo o tempo e recurso para o desenvolvimento da pesquisa não são gastos diretamente em um primeiro planejamento. Isto porque muitas vezes se está longe das condições ótimas.

Portanto, a análise dos efeitos como informação inicial pode dirigir sequencialmente o pesquisador, através de novos fatoriais fracionados até se chegar ao completo, atingindo-se as condições desejadas. A relação custo x benefício é muito importante nesta escolha. Ela é o diferencial para planejar criteriosamente e se chegar às condições de otimização mais rapidamente, a um menor custo e com o suporte estatístico na discussão dos resultados (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

A finalidade do planejamento experimental visa determinar os efeitos dos fatores ou variáveis do processo e da interação entre eles sobre o resultado do experimento fatorial. Em geral, apenas dois níveis de fatores são usados neste tipo de delineamento: um menor fator representado pelo sinal (-) e um superior, representado pelo sinal (+), e todas as combinações possíveis destes dois níveis são investigados. O número de experimentos necessários em um delineamento fatorial com dois níveis é dado por 2^k , onde 2 e k representam os níveis e número de variáveis, respectivamente (MONTGOMERY, 2003). Sabendo-se quais parâmetros avaliados possuem maior efeito sobre a resposta em estudo, a utilização de outra

ferramenta estatística é muito eficiente para maioria dos casos estudados, o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Segundo Rodrigues e lemma (2005), o DCCR é um Delineamento Composto Central que tem pontos axiais definidos. De modo geral, em um DCCR com 2 níveis originais, tem-se 2^k pontos fatoriais + 2K pontos axiais + um número arbitrário de pontos centrais.

O Delineamento Composto Central é uma alternativa que possibilita a exploração de todo o espaço amostral com um menor número de ensaios. No entanto, é necessário pressupor que o estudo da superfície de resposta ocorre em intervalos dos fatores de interesse com provável ajuste de um modelo de 1º grau. Este tipo de Delineamento possui um valor de α que o particulariza, pois o mesmo é estabelecido para tornar os coeficientes de regressão ortogonais, ou para dar ao delineamento a propriedade de ser rotacional (DCCR), isto é, todos os pontos são equidistantes do ponto central (MATEUS, BARBIN e CANAGIN, 2001).

Outra ferramenta muito utilizada para otimização de processos é a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), metodologia desenvolvida por Box e Wilson em 1951 (BOX, 1978). De forma geral, consiste em técnicas de análise e planejamento de experimentos empregados na modelagem matemática de respostas, ou seja, procura-se identificar o relacionamento que existe entre os fatores controláveis (variáveis independentes) e as respostas (variáveis dependentes) do sistema analisado (MYERS e MONTGOMERY, 1995). Este é um método estatístico eficaz para a otimização de variáveis e obtenção do ponto ótimo, sendo amplamente utilizada para otimizar os parâmetros de um processo, determinar as condições ótimas para as investigações químicas e maximizar os rendimentos das reações. Através de um cuidadoso planejamento e análise de experimentos, a MSR busca relacionar uma resposta, ou variável de saída, aos níveis dos fatores de entrada. Em geral a variável resposta é representada por “Y”, e é função de variáveis independentes ou fatores $X_1, X_2, \dots, X_k$ (MONTGOMERY, 2003).

As vantagens da utilização da MSR incluem a redução do número de ensaios experimentais, necessários para avaliar vários parâmetros e da capacidade da ferramenta estatística para identificar interações. Além de analisar os efeitos das variáveis independentes, a metodologia experimental também gera um modelo matemático que descreve o processo global (BATISTA, 1999).

Os planejamentos experimentais discutidos vêm sendo muito utilizados em experimentos de uma forma geral. Rajendran e Thangavelu (2009) utilizaram o fatorial fracionado com o objetivo de elaborar um modelo matemático para a síntese de lipase de *Rhizopus arrhizus* obtendo a sua condição de cultivo mais adequada. Freitas et al. (2009) utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta para otimizar as condições da reação de esterificação do glicerol com ácido láurico empregando lipase de *Candida antarctica* imobilizada em POS-PVA, variando os efeitos da temperatura e razão molar glicerol/ácido láurico, aumentando de 21,0 para 31,31% a taxa de conversão.

CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE LIPASE POR *Fusarium oxysporum* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO UTILIZANDO DELINEAMENTO FATORIAL (DCCR) E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (MSR)

1. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LABI) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus Assis, com parte dos experimentos sendo realizados no Biorefining Research Institute (BRI) da Lakehead University – Thunder Bay/ON Canadá em colaboração com o Dr. Robert Frans Huibert Dekker.

1.1. Micro-organismo

A cepa do fungo filamentoso *Fusarium* sp. FCLA MA41, isolada da Mata Atlântica, foi identificada como *Fusarium oxysporum* através de ensaios morfológicos e moleculares pela Dr^a. Derlene Attilis D'Angelis, do Depto. de Bioquímica e Microbiologia da UNESP de Rio Claro.

A cepa de *F. oxysporum* FCLA MA41 foi mantida em meio MEA (extrato de malte ágar) com incubação por um período de 5-7 dias à temperatura de 28 °C. Após crescimento, foi preparada uma suspensão de esporos com concentração de 10⁸ esp/mL, adicionada de glicerol de modo a se obter uma suspensão a 20% de glicerol. Essa suspensão foi dividida em microtubos tipo “eppendorf”, mantidos a -20 °C.

1.2. Esterilização dos meios e equipamentos

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

1.3. Produção da enzima em fermentação submersa

O meio de cultivo inicial padrão para produção de lipase por *F. oxysporum* foi composto de óleo de milho 1,0% (m/v), tensoativo Tween 80 1,5% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v), utilizando Erlenmeyers de 500 mL para o pré-inóculo e 1000 mL para a fermentação. O pré-inóculo foi iniciado pela transferência de 3 discos de ágar e micélio de 0,25 cm² para Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo mantidos por 48 h a 28 °C e 180 rpm. Após este período o conteúdo era transferido para Erlenmeyers de 1000 mL com 100 mL de meio fermentativo de mesma composição por 24 h. Após a fermentação o sobrenadante foi utilizado para investigação de atividade enzimática, concentração de proteínas, determinação do pH e biomassa.

Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta (MSR) (RODRIGUES e IEMMA, 2005) foram usados para estudar a influência das variáveis do meio de cultura na produção da lipase, medida como atividade lipolítica. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software computacional STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.) para calcular os efeitos principais das variáveis e suas interações, bem como os dados relativos à Análise de Variância (ANOVA). A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar as condições de fermentação e fornecer um modelo matemático adequado.

1.3.1. Efeito da concentração de fonte de carbono e surfactantes

A influência da concentração da fonte de carbono e presença de surfactantes na fermentação de *F. oxysporum* foi avaliada por dois delineamentos experimentais 2² independentes com 11 experimentos contendo três repetições do ponto central e quatro pontos axiais (Tabela I.1). As variáveis independentes avaliadas foram óleo de milho (X1) e Tween 80 ou Triton X-100 (X2), utilizando extrato de levedura (0,5%, m/v) como fonte de nitrogênio (Tabela I.2).

Tabela I.1: Matriz do DCCR 2² para estudo da influência da concentração de óleo de milho (X1) e tensoativo Tween 80 ou Triton X-100 (X2).

Ensaio	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	- α	0
6	+ α	0
7	0	- α
8	0	+ α
9	0	0
10	0	0
11	0	0

$\alpha = 1,41$.

Tabela I.2: Especificação dos níveis das variáveis utilizadas nos DCCR 2².

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
X1 - Óleo de milho (% v/v)	0,00	0,29	1,00	1,71	2,00
X2 - Tensoativo – Tween 80 ou Triton X-100 (% m/v)	0,00	0,29	1,00	1,71	2,00

$\alpha = 1,41$.

Os experimentos dos Capítulos II e III foram realizados com base nos resultados destes delineamentos.

1.3.2. Efeito de diferentes fontes de carbono

Utilizando meio de cultivo inicial como base, foi estudado o efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção da lipase pelo fungo *F. oxysporum*. O meio foi modificado adicionando-se 1% (v/v) de diferentes fontes lipídicas: óleos vegetais (oliva, milho, soja, crambe, dendê e linhaça), gordura de frango e glicerol.

1.3.3. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio

Para o estudo da influência das fontes de nitrogênio sobre a produção da enzima foram utilizados meios de cultivo contendo 1,79% (v/v) de óleo de milho e 1,79% (m/v) de Triton X-100 adicionando-se diferentes fontes de nitrogênio: extrato de levedura (20 g/L), ureia (4,3 g/L), nitrato de sódio (12 g/L), nitrato de amônio (5,7

g/L) e sulfato de amônio (9,4 g/L). Para as fontes de nitrogênio inorgânicas foi adicionado meio de Vogel (VOGEL, 1956).

1.3.4. Otimização da produção da enzima em fermentação submersa utilizando a melhor fonte de carbono e nitrogênio de acordo com experimentos anteriores (1.3.2 e 1.3.3)

A influência das concentrações da fonte de carbono (X1), nitrogênio (X2), tensoativo Triton X-100 (X3) e complemento de extrato de levedura (X4) (Tabela I.3) na fermentação de *F. oxysporum* foi avaliada por DCCRs 2⁴ com 28 experimentos contendo quatro repetições do ponto central e oito pontos axiais (Tabela I.4)

Para todos os ensaios foram utilizados frascos Erlenmeyers de 250 mL, com 50 mL de meio fermentativo, mantidos a 28 °C e 180 rpm. Após 72 h, o cultivo foi interrompido e o sobrenadante de fermentação filtrado para separação de células. A análise dos resultados foi realizada utilizando o software STATISTICA 8.0 (Statsoft Inc.).

Tabela I.3: Especificação dos níveis das variáveis usadas no DCCR 2⁴ avaliando fonte de carbono (X1), Triton X-100 (X2), fonte de nitrogênio (X3) e extrato de levedura (X4).

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
X1 - Fonte de carbono (% v/v)	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00
X2 - Triton X-100 (% m/v)	0,00	0,50	1,00	1,50	2,00
X3 - Fonte de nitrogênio (% m/v)	0,10	0,45	1,00	1,55	1,90
X4 - Ext. levedura (% m/v)	0,000	0,025	0,050	0,075	0,100

$\alpha = 2,0$.

Tabela I.4: Matriz do DCCR 2⁴ para estudo da influência da concentração da fonte de carbono (X1), tensoativo Triton X-100 (X2), fonte de nitrogênio (X3) e extrato de levedura (X4) na fermentação do fungo *Fusarium oxysporum*.

Ensaio	X1	X2	X3	X4
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	-1	+1
3	-1	-1	+1	-1
4	-1	-1	+1	+1
5	-1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1
8	-1	+1	+1	+1
9	+1	-1	-1	-1
10	+1	-1	-1	+1
11	+1	-1	+1	-1
12	+1	-1	+1	+1
13	+1	+1	-1	-1
14	+1	+1	-1	+1
15	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1
17	- α	0	0	0
18	+ α	0	0	0
19	0	- α	0	0
20	0	+ α	0	0
21	0	0	- α	0
22	0	0	α	0
23	0	0	0	- α
24	0	0	0	α
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0
28	0	0	0	0

$\alpha = 2,0$.

1.4. Métodos Analíticos

1.4.1. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

A atividade lipolítica das amostras foi mensurada a partir da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima (2004). O método baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima em meio aquoso contendo como surfactante Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, é seguida de

leitura em espectrofotômetro a 410 nm (Figura I.1). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 $\mu\text{mol/min.}$ de *p*NP. A concentração do *p*NP foi obtida pela equação $A = \epsilon.b.c$, sendo que ϵ corresponde ao coeficiente de extinção molar do *p*NP, A corresponde a absorbância, b é o caminho ótico (1 cm) e c a concentração molar de *p*NP. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($1,50 \times 10^4 \text{ mol.L/cm.min.}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

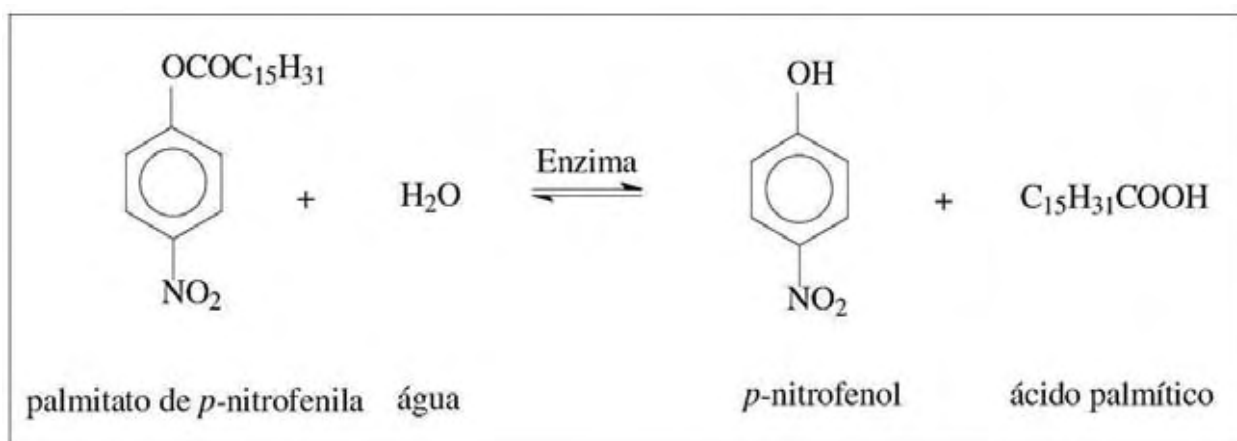


Figura I.1: Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

1.4.2. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas durante os cultivos e ensaios de imobilização foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Produção da enzima em fermentação submersa

2.1.1. Influência de tensoativos

A maior parte dos estudos mostra que lipases de *Fusarium* são geralmente induzidas por substratos como óleo de milho, sendo que sua concentração ideal ainda não foi descrita (MASE, MATSUMIYA e MATSUURA, 1995; MAIA et al., 2001 e CAMARGO-DE-MORAIS et al., 2003). Além do óleo, a presença de tensoativos é

um fator importante que influencia na produção de lipases, como pode ser observado nos trabalhos de Abdel-Fattah e Hammad (2002) e Sifour et al. (2010) estudando produção de lipase com a presença de Tween 80 por *Geobacillus thermoleovorans* e *G. stearothermophilus*, respectivamente. Tween 80 e Triton X-100 também foram estudados como componentes do meio de fermentação induzindo produção de lipase com *F. oxysporum* (PRAZERES, CRUZ e PASTORE, 2006) e *Fusarium globulosum* (GULATI et al., 2005), porém sem descrição de sua concentração ideal.

2.1.1.1. Influência da concentração de Tween 80 e de óleo de milho

Um DCCR 2² foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: concentração de óleo de milho (X1) e de tensoativo Tween 80 (X2). A fonte de nitrogênio (extrato de levedura (0,5%, m/v)) e o tempo de fermentação (72 h) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da temperatura de fermentação de 28 °C.

A tabela I.5 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (U/mL) e atividade enzimática específica (U/mg) após o processo fermentativo. Neste estudo a maior atividade lipolítica (2,77 U/mL) foi observada no ensaio 7, que corresponde a 1,0% de óleo de milho e 0,0% de Tween 80. Estes resultados indicam que a adição de Tween 80 possui efeito antagônico para a produção de lipase por *F. oxysporum*. A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na tabela I.6, onde se observou também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R² e o nível de significância.

Tabela I.5: Matriz do DCCR 2² contendo três repetições do ponto central após 72 h de fermentação com *Fusarium oxysporum*.

Ensaio	X1	X2	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	1,53	21,81	2,20
2	-1	+1	1,20	19,99	4,20
3	+1	-1	1,32	8,24	2,30
4	+1	+1	0,52	5,73	10,50
5	- α	0	0,81	20,23	2,20
6	+ α	0	0,52	0,74	6,60
7	0	-α	2,77	6,09	6,40
8	0	+ α	0,51	1,93	10,10
9	0	0	0,82	4,96	6,10
10	0	0	0,96	4,57	6,30
11	0	0	0,76	8,97	6,80

X1: óleo de milho; X2: Tween 80. $\alpha = 1,41$.

Tabela I.6: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de *Fusarium oxysporum* para o DCCR 2² com óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficientes de regressão
Intercepto	0,84671	0,197793	0,007857	0,846714
X1 (L)	-0,32569	0,242610	0,237172	-0,162847
X1 (Q)	-0,18875	0,289497	0,543180	-0,094376
X2 (L)	-1,08237	0,242610	0,006632	-0,541185
X2 (Q)	0,79208	0,289497	0,040983	0,396042
X1 x X2	-0,23500	0,342591	0,523251	-0,117500

Os efeitos de X1 e da interação entre X1 e X2 não foram estatisticamente significativos em um limite de confiança de $p < 0,05$. No entanto, a variável X2 (Tween 80) isolada foi estatisticamente significativa. Assim, um efeito antagônico foi observado, causando uma perda média de atividade de 1,08 U/mL quando se passa do nível (-) para nível (+).

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura I.2), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado. Observa-se que X2 possui influência negativa na

resposta; aumentando esta variável haverá decréscimo no valor da atividade enzimática.

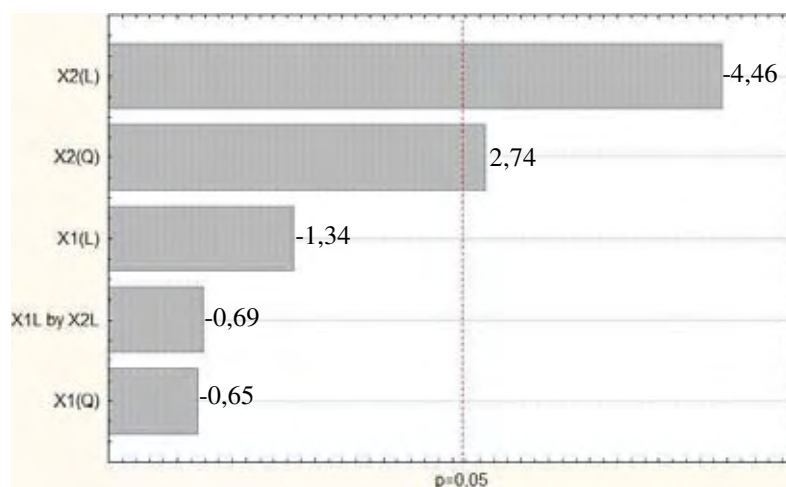


Figura I.2: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2² utilizando óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).

Pelo teste F, se F calculado (Tabela I.7) for maior que o valor de F tabelado, o modelo é válido e os parâmetros da equação se ajustam aos dados experimentais. Assim, tem-se que o valor tabelado de F para um intervalo de confiança de 95% e com os graus de liberdade, para atividade enzimática (U/mL) é: $F(1;5;0,05) = 6,61$.

Tabela I.7: Análise de variância obtida para o DCCR 2² com óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-Valor
X1 (L)	0,211522	1	0,211522	1,80220	0,237172
X1(Q)	0,049894	1	0,049894	0,42510	0,543180
X2 (L)	2,336079	1	2,336079	19,90376	0,006632
X2 (Q)	0,878635	1	0,878635	7,48611	0,040983
X1 x X2	0,055225	1	0,055225	0,47053	0,523251
Resíduo	0,586844	5	0,117369	-	-
Total	4,337673	10	-	-	-

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: quadrado médio. $R^2 = 0,847$; $R = 0,920$. $F_{\text{tab}}(1;5;0,05) = 6,61$.

Desta forma, para X2, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$, portanto o modelo proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo matemático da atividade enzimática (Equação I.1).

$$U/mL = 0,8467 - 0,1628.(X1) - 0,0943.(X1)^2 - 0,5412.(X2) + 0,396.(X2)^2 - 0,1175(X1.X2) \quad (I.1)$$

A superfície de resposta e o diagrama de contorno obtido para o modelo são apresentadas nos gráficos da figura I.3 (A) e (B), respectivamente. Como mencionado anteriormente, conforme a concentração de Tween 80 (X2) aumenta a atividade enzimática diminui, sendo que os maiores valores de atividade são obtidos na região onde não há adição de tensoativo. Assim, o efeito repressor pode também ter mascarado os efeitos da fonte de carbono (X1) sobre a produção da enzima, já que não houve nenhum efeito observado para esta variável.

Para produção de proteína, os efeitos das variáveis X1 e X2 e a interação das mesmas não foram estatisticamente significativos em um limite de confiança de $p < 0,05$.

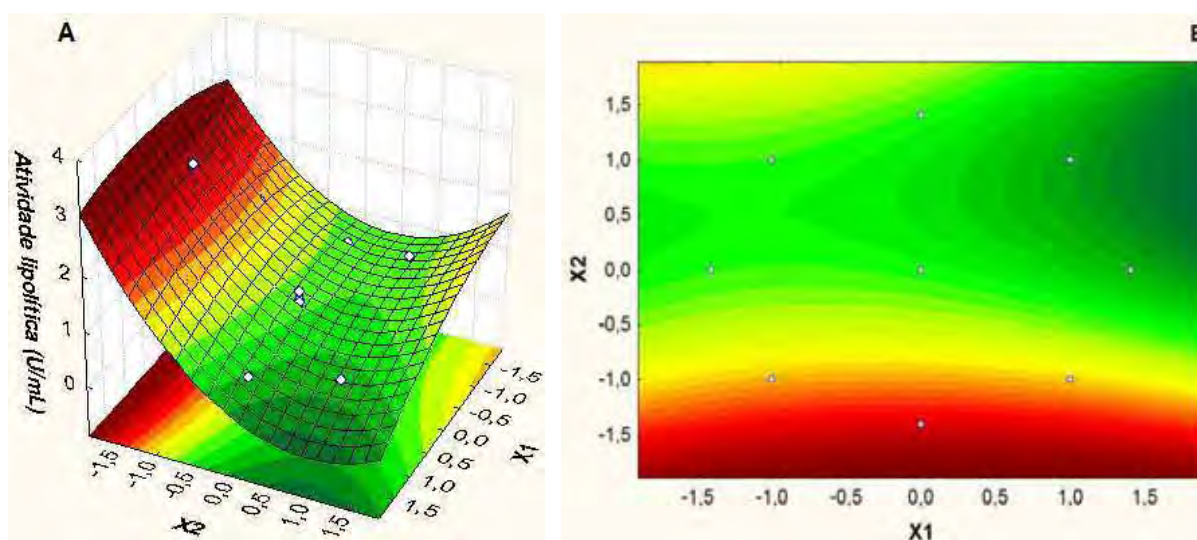


Figura I.3: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) de atividade enzimática (U/mL) obtida por fermentação submersa de *Fusarium oxysporum* em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Tween 80 (X2).

Os valores previstos e experimentais para a atividade enzimática (U/mL) estão apresentados na Figura I.4.

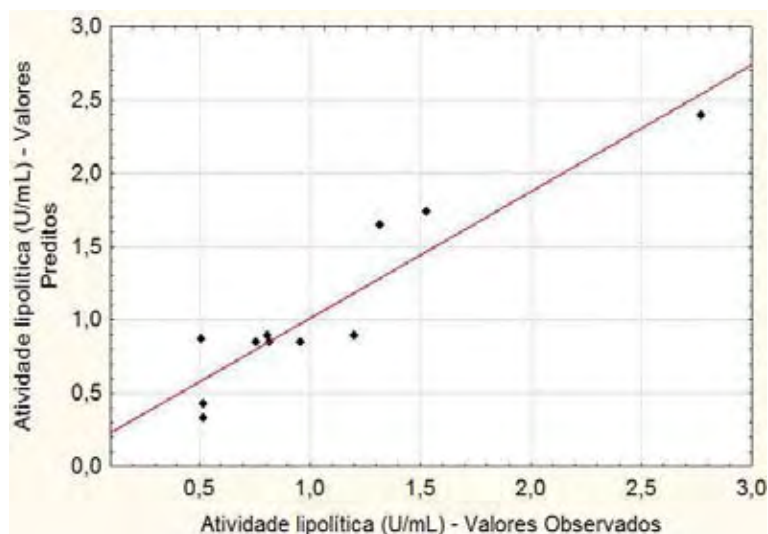


Figura 1.4: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).

Segundo Li, Cheng e Chen (2001), o efeito do Tween 80 em alta concentração diminuiu a produção de lipase pela bactéria *Acinetobacter radioresistens*, por repressão da síntese dessa proteína. O mesmo pode ter ocorrido no presente estudo. Outra explicação para a baixa produção enzimática observada com a presença de Tween 80 é que os surfactantes podem causar desnaturação da enzima pela quebra da sua estrutura terciária (LIMA et al., 2004).

2.1.1.2. Influência da concentração de Triton X-100 e óleo de milho.

Um segundo DCCR 2^2 foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: concentração de óleo de milho (X1) e de tensoativo Triton X-100 (X2). A fonte de nitrogênio (extrato de levedura (0,5%, m/v)) e o tempo de fermentação (72h) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da temperatura de fermentação de 28 °C.

A tabela 1.8 apresenta a matriz do delineamento, com as variáveis nas suas formas codificadas e os resultados obtidos de atividade enzimática (U/mL), atividade enzimática específica (U/mg) e biomassa (g) após o processo fermentativo. Neste estudo, as maiores atividades foram obtidas nos experimentos 4, 6 e 8, nos quais foram observados valores de atividade de 3,88; 3,69 e 3,26 U/mL, respectivamente. A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para atividade enzimática (U/mL) são apresentados na tabela 1.9, além dos valores obtidos para o

erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância.

Tabela I.8: Matriz do DCCR 2^2 contendo três repetições do ponto central após 72 h de fermentação com *Fusarium oxysporum*.

Ensaio	X1	X2	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	0,77	4,07	9,00
2	-1	+1	1,95	1,49	9,30
3	+1	-1	1,35	0,25	8,60
4	+1	+1	3,88	0,12	17,80
5	- α	0	0,82	2,29	5,90
6	+α	0	3,69	0,46	5,70
7	0	- α	1,27	5,70	9,60
8	0	+α	3,26	0,36	18,40
9	0	0	2,45	0,34	7,40
10	0	0	2,44	0,36	4,50
11	0	0	2,57	0,97	6,80

X1: óleo de milho; X2: Triton X-100. $\alpha = 1,41$.

Tabela I.9: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de *Fusarium oxysporum* para o delineamento rotacional 2^2 com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficiente
Intercepto	2,484824	0,192387	0,000050	2,484824
X1 (L)	1,645187	0,235979	0,000934	0,822593
X1 (Q)	-0,363692	0,281585	0,252979	-0,181846
X2 (L)	1,636008	0,235979	0,000958	0,818004
X2 (Q)	-0,357824	0,281585	0,259730	-0,178912
X1 x X2	0,682250	0,333228	0,095960	0,341125

A partir da análise dos efeitos (Tabela I.9), é possível observar que a interação das variáveis X1 e X2 não foi significativa em um limite de confiança de $p < 0,05$. No entanto, as variáveis isoladas foram estatisticamente significativas. Assim, X1 (óleo de milho) e X2 (Triton X-100), possuem influência positiva na resposta, aumentando estas variáveis haverá um aumento no valor da atividade enzimática, causando acréscimo médio de atividade de 1,65 e 1,64 U/mL quando se passa do nível (-) para nível (+), respectivamente.

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura I.5), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o

valor do efeito padronizado. Observa-se que ambas as variáveis possuem influência positiva na resposta.

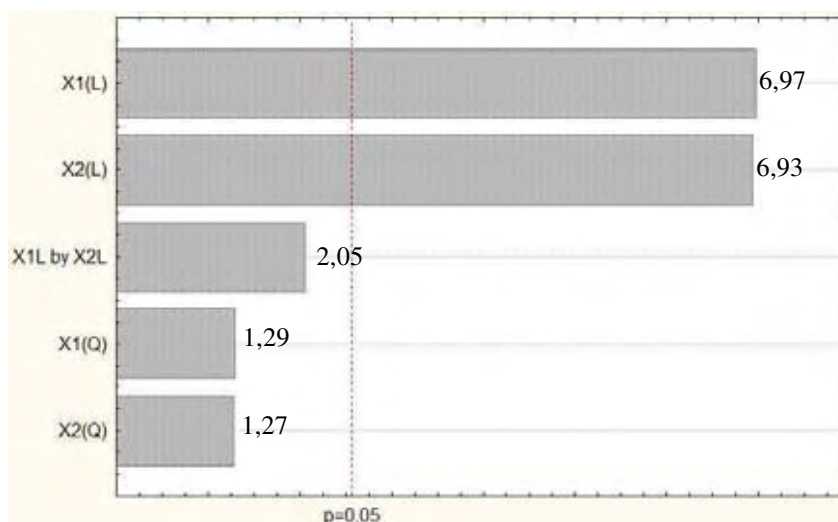


Figura I.5: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2² utilizando óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

Pelo teste F, foi possível verificar que, para as variáveis estudadas, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ (Tabela I.10), portanto o modelo proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo matemático da atividade enzimática (Equação I.2).

$$U/mL = 2,4848 + 0,8226.(X1) - 0,1818(X1)^2 + 0,8180.(X2) - 0,1789.(X2)^2 + 0,3411.(X1.X2) \quad (I.2)$$

Tabela I.10: Análise de variância obtida para atividade enzimática (U/mL) no DCCR 2² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F_{calc}	p-Valor
X1 (L)	5,39718	1	5,397176	48,60525	0,000934
X1(Q)	0,18524	1	0,185240	1,66821	0,252979
X2 (L)	5,33712	1	5,337121	48,06442	0,000958
X2 (Q)	0,17931	1	0,179310	1,61481	0,259730
X1 x X2	0,46547	1	0,465465	4,19183	0,095960
Resíduo	0,55521	5	0,111041	-	-
Total	12,03728	10	-	-	-

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: quadrado médio. $R^2 = 0,954$; $R = 0,977$. $F_{\text{tab}} (1;5;0,05) = 6,61$.

Os valores previstos e experimentais para a atividade enzimática (U/mL) estão apresentados na Figura I.6.

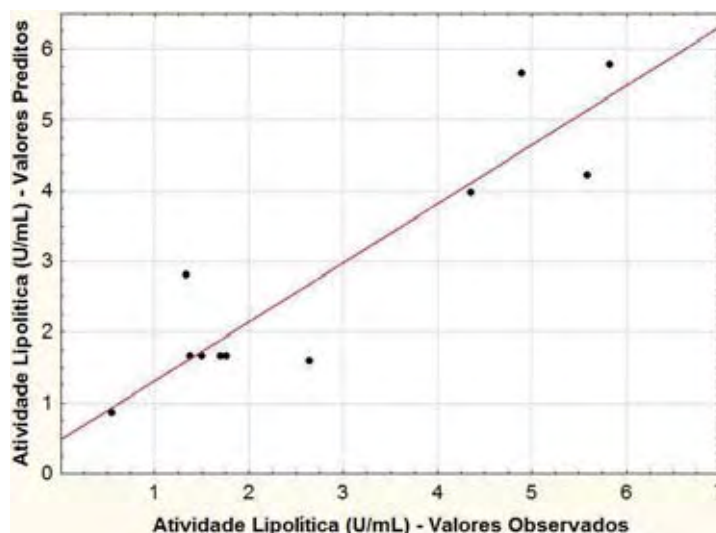


Figura I.6: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).

A superfície de resposta e o diagrama de contorno obtido para o modelo são apresentados nos gráficos da figura I.7 (A) e (B), respectivamente. Como mencionado anteriormente, conforme as concentrações de óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2) vão aumentando a atividade enzimática tende a também aumentar, os maiores valores de atividade são obtidos na região onde há as maiores concentrações de X1 e X2.

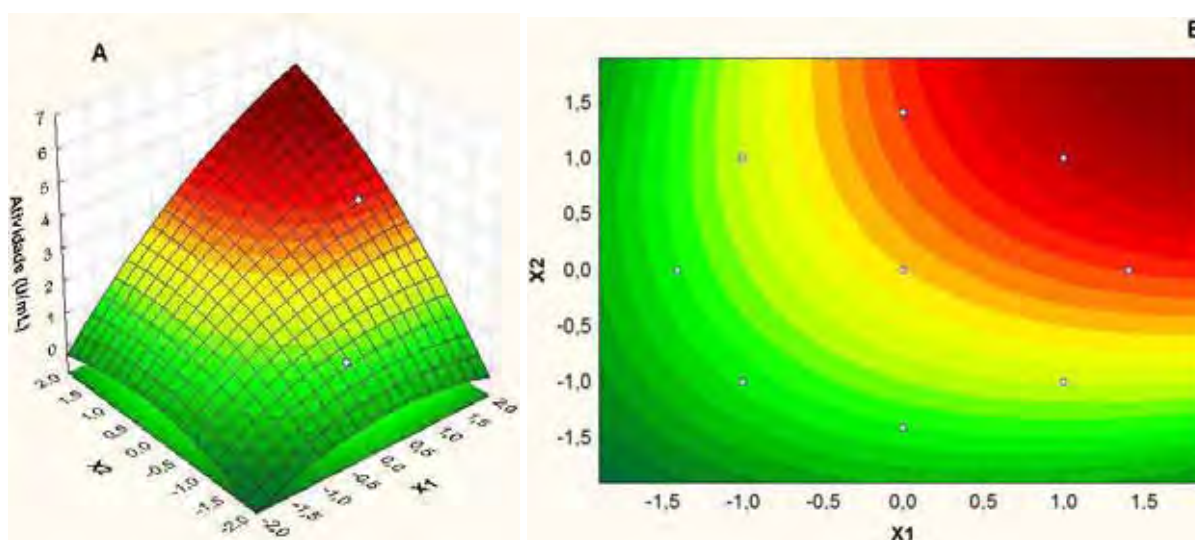


Figura I.7: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) de atividade enzimática (U/mL) obtida por fermentação submersa de *Fusarium oxysporum* em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

No delineamento em estudo, os maiores valores de biomassa foram obtidos nos experimentos 4 e 8 com 17,8 e 18,4 g/L, respectivamente (Tabela I.8). A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para a produção de biomassa (g/L) é apresentada na tabela I.11, além dos valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância.

Tabela I.11: Estimativa dos efeitos para produção de biomassa (g/L) de *Fusarium oxysporum* para o delineamento rotacional 2^2 com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coeficientes de regressão
Intercepto	6,228363	1,085532	0,002253	6,228363
X1 (L)	1,960332	1,331498	0,200928	0,980166
X1 (Q)	0,199323	1,588823	0,905053	0,099662
X2 (L)	5,493343	1,331498	0,009123	2,746671
X2 (Q)	8,448405	1,588823	0,003147	4,224203
X1 x X2	4,450000	1,880219	0,064211	2,225000

A partir da análise dos efeitos (Tabela I.11), é possível observar que a interação das variáveis X1 e X2 não foi significativa em um limite de confiança de $p < 0,05$. No entanto, a variável X2 isolada foi estatisticamente significativa. Assim, X2 (Triton X-100), possui influência positiva na resposta, aumentando esta variável haverá um aumento na produção de biomassa, causando acréscimo médio de 0,55 g/L, respectivamente.

Pelo teste F, foi possível verificar que, para as variáveis estudadas, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ (Tabela I.12), portanto o modelo proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente o modelo matemático da atividade enzimática (Equação I.3).

$$U/\text{mL} = 6,2284 + 0,9802.(X1) + 0,0996.(X1)^2 + 2,7467.(X2) + 4,2242.(X2)^2 + 2,2250.(X1.X2) \quad (\text{I.3})$$

Tabela I.12: Análise de variância obtida para produção de biomassa no DCCR 2² com óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-Valor
X1 (L)	7,6629	1	7,66294	2,16760	0,200928
X1(Q)	0,0556	1	0,05564	0,01574	0,905053
X2 (L)	60,1741	1	60,17408	17,02129	0,009123
X2 (Q)	99,9574	1	99,95745	28,27471	0,003147
X1 x X2	19,8025	1	19,80250	5,60148	0,064211
Resíduo	17,6761	5	3,53522	-	-
Total	213,1055	10	-	-	-

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: quadrado médio. $R^2 = 0,917$; $R = 0,958$. $F_{\text{tab}}(1;5;0,05) = 6,61$.

Os valores previstos e experimentais para a produção de biomassa (g/L) estão apresentados na Figura I.8.

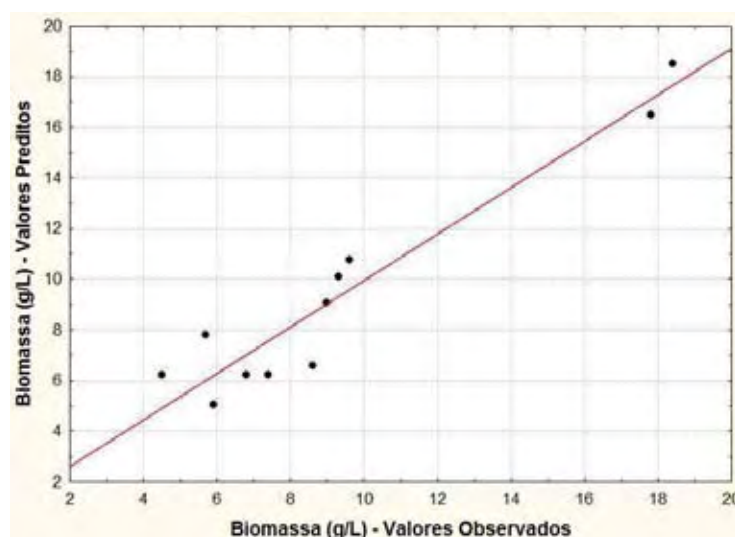


Figura I.8: Relação entre valores observados e previstos para produção de biomassa (g/L).

A superfície de resposta e o diagrama de contorno obtido para o modelo são apresentados nos gráficos da figura I.9 (A) e (B), respectivamente. Como mencionado anteriormente, conforme a concentração de Triton X-100 (X2) aumenta a produção de biomassa tende a também aumentar, os maiores valores de produção de biomassa são obtidos na região onde há as maiores concentrações de X2.

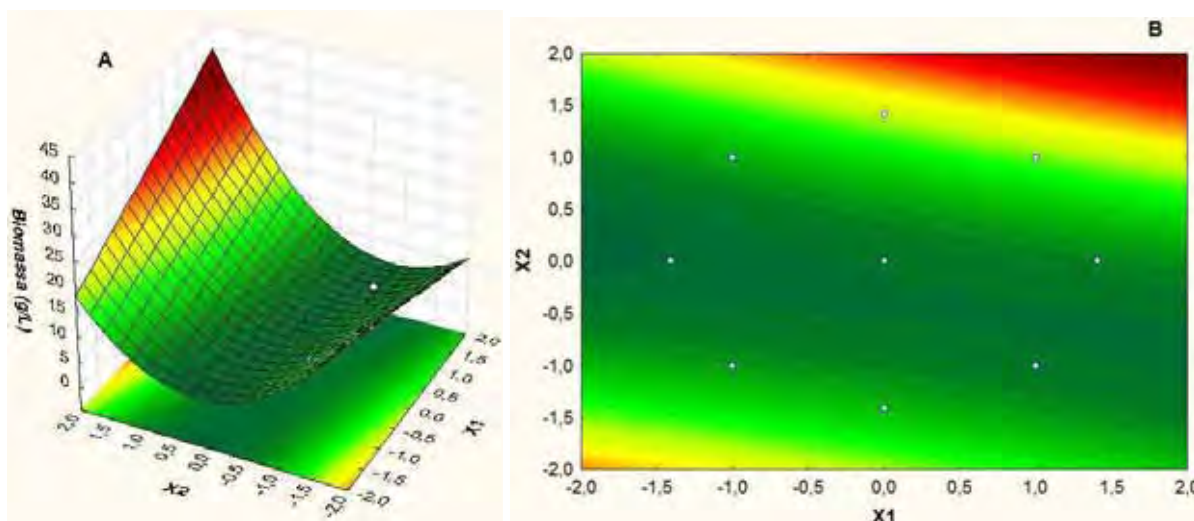


Figura I.9: Superfície de resposta (A) e diagrama de contorno (B) para produção de biomassa (g/L) por fermentação submersa de *Fusarium oxysporum* em meio com diferentes concentrações de óleo de milho (X1) e Triton X-100 (X2).

2.1.1.2.1. Considerações gerais.

É possível observar que este modelo não é conclusivo, já que o gráfico não apresenta uma região onde a atividade enzimática é máxima e sim uma resposta crescente (Figura I.7). Assim, os resultados indicam que uma melhor produção da enzima ocorreria com concentração de óleo de milho e Triton X-100 acima de 2,0% (m/v), o que traria várias complicações como alteração da aeração do meio de cultivo, e surfactante residual que dificultaria a eventual purificação da proteína. A adição de concentrações crescentes de óleo vegetal e principalmente de tensoativos ao meio de cultivo pode alterar o metabolismo e a síntese de lipase.

Devido a estas considerações, foi definida como condição equilibrada de produção de lipase por *F. oxysporum* a adição de 1,79% de óleo de milho e 1,79% de Triton X-100 com valor previsto de atividade enzimática de $6,11 \pm 4,3$ U/mL. A validação, realizada de acordo com as concentrações descritas e em quintuplicata, foi satisfatória apresentando atividade enzimática de $8,3 \pm 0,26$ U/mL (Tabela I.11).

Tabela I.13: Validação para melhor resultado do DCCR 2^2 com óleo de milho (1,79%. m/v) e Triton X-100 (1,79%, m/v).

Atividade enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g)
$8,30 \pm 0,26$	$9,55 \pm 1,12$	$1,15 \pm 0,68$	$1,42 \pm 0,27$

A presença do surfactante pode influenciar a produção de lipases pelo seu efeito emulsificante facilitando o contato do micro-organismo com a fonte de carbono apolar em meio aquoso e aumentando assim a produção da enzima.

Os delineamentos realizados foram satisfatórios, pois identificaram os surfactantes Tween 80 e Triton X-100 como inibidor e indutor da produção de lipase pelo fungo *Fusarium oxysporum*, respectivamente. A partir da análise de superfície de resposta foi possível aumentar a produção de lipase em 110,2%. Nos ensaios de imobilização da lipase (Cap. II) e reações de caracterização (Cap. III) foram utilizadas estas condições de produção da enzima.

2.1.2. Influência de diferentes fontes de carbono

O carbono é o principal componente da célula e gorduras ou óleos têm sido amplamente utilizados como fonte de carbono e indutores da produção de lipase por micro-organismos. A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Meios de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos têm sido empregados na obtenção de um rendimento elevado de lipase (MARTINS, KALIL e COSTA, 2008). As lipases são enzimas que tem como substratos naturais triacilgliceróis de cadeia longa, sendo a trioleína comumente utilizada como substrato padrão para estas enzimas. Além disso, tanto a presença de trioleína, quanto de ácido oléico, livre ou esterificado, têm sido citados como indutores da produção da enzima quando adicionados ao meio cultivo (FERNANDES, 2007).

As fontes de carbono utilizadas neste trabalho diferem entre si na composição de ácidos graxos e consequentemente na concentração de ácido oléico e outros ácidos graxos de cadeia longa. A composição com relação aos ácidos graxos predominantes em cada fonte de carbono é apresentada na Tabela I.14.

Tabela I.14: Perfil de ácidos graxos de cadeia longa predominantes nos diferentes óleos vegetais utilizados como fonte de carbono.

Fonte de carbono	Ácidos graxos predominantes (%)				
	Oléico (18:1)	Linoleico (18:2)	Linolênico (18:3)	Erúcico (22:1)	Palmítico (16:0)
Oliva (PIMENTEL et al., 2007)	63	12	< 1	-	18
Frango (CENTENARO, FURLAN e SOARES, 2008)	55	17	-	-	18
Dendê (MALACRIDA, 2003)	40	10	< 1	-	44
Milho (BECKER, 2007)	26	58	< 1	-	11
Soja (JUNIOR, 2010)	24	54	6	< 1	11
Crambe (JUNIOR, 2010)	18	9	6	56	2
Linhaça (PITA et al., 2006)	14	14-25	40-60	-	-

Para maior clareza, os resultados de atividade enzimática foram apresentados divididos entre as fontes de carbono com maior conteúdo de ácido oleico (oliva, dendê e gordura de frango), na Figura I.10 A, e as demais fontes, com conteúdo menor ou ausente desse ácido graxo (soja, crambe, linhaça e glicerol), na Figura I.10 B. É interessante notar que embora o conteúdo de ácido oleico varie entre 63% e 18% (oliva e crambe, respectivamente), o maior valor de atividade enzimática observado foi em média de 4,4 U/mL em 48h de cultivo, em todas as fontes de carbono testadas, com exceção dos cultivos com linhaça. O óleo de linhaça apresenta o menor valor de ácido oleico (14%), o que pode estar relacionado a menor atividade obtida nestes cultivos, 2,91 U/mL em 120 h de fermentação.

Nos meios contendo glicerol, apesar de apresentar resultado inferior aos óleos testados, foi observada atividade significativa (1,57 U/mL, após 120 h). Resultado interessante, pois mostra que o glicerol, mesmo sendo um poliálcool, induz a produção de lipase. O glicerol é subproduto de alguns processos industriais, como a transesterificação química ou enzimática de óleos vegetais para a produção de biodiesel. Embora a tecnologia de transesterificação enzimática, por lipases, ainda seja um processo em desenvolvimento, a possibilidade de utilização de um subproduto da catálise para produção da enzima, pode ser relevante para a redução de custos, contribuindo para a implantação desse processo.

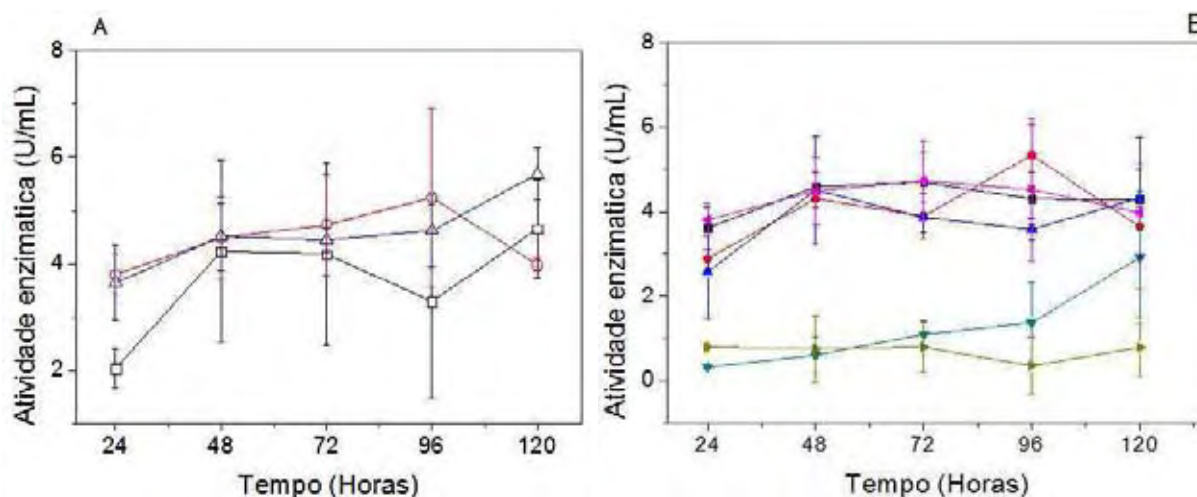


Figura 1.10: Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em diferentes fontes de carbono. **A)** Fontes de carbono com maior conteúdo de ácido oleico: (□) dendê, (△) frango e (○) oliva. **B)** fontes de carbono com menor conteúdo de ácido oleico: (■) milho, (●) soja, (▲) crambe, (▼) linhaça, (◄) oliva e (►) glicerol. O óleo de oliva foi incluído nas duas figuras para comparação dos resultados. Condições de cultivo: 180 rpm, 28 °C. Atividade lipolítica determinada pela hidrólise do pNPP.

Considerando diferentes tempos de cultivo, com os óleos de dendê e soja e gordura de frango, a atividade enzimática permaneceu constante após 48h, não havendo diferença estatística entre os valores obtidos entre 48 e 120 h. Por outro lado, com os óleos de milho, crambe e oliva, as medidas de atividade obtidas com 24 h de cultivo não apresentaram diferença significativa em relação às análises de tempos maiores, ainda que valores médios maiores tenham sido verificados a partir de 48 h.

Comparando as atividades lipolíticas obtidas com as diferentes fontes de carbono em 48h de cultivo, não foi verificada diferença estatística entre os resultados obtidos com os óleos de dendê, milho, soja, oliva, crambe e gordura de frango. Apenas com óleo de linhaça e glicerol foram obtidos valores de atividade significativamente menores (Tabela 1.15).

Os resultados apresentados tem grande importância, pois indicam a possibilidade de produção de lipase por *F. oxysporum* com diferentes fontes de carbono, de custos variados, com o mesmo rendimento. Inclusive, óleo de oliva, de alto custo e não produzido no Brasil, pode ser substituído sem prejuízo, por óleos de custo menor e produzidos no país. Sob esse ponto de vista, destaca-se o óleo de crambe, cuja cultura está sendo implantada no Brasil, no estado do Mato Grosso do Sul. Trata-se de uma oleaginosa que proporciona grande porcentagem de óleo não

comestível, o que representa uma alternativa interessante às demais fontes que são utilizadas como alimento humano ou animal (JUNIOR, 2010).

O óleo de frango, obtido da etapa de abate (FÉLIX, 2010), é um descarte de frigorífico, sendo resíduo que pode ser utilizado para produção de enzimas, de alto valor agregado.

Tabela I.15: Atividade lipolítica dos meios fermentativos contendo diferentes fontes de carbono em 48 h de cultivo.

Fonte lipídica	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Dendê	4,23 ± 1,71 a	3,81 ± 2,29
Milho	4,59 ± 0,33 a	7,03 ± 4,48
Crambe	4,50 ± 1,29 a	7,33 ± 0,94
Oliva	4,48 ± 0,78 a	6,91 ± 1,16
Frango	4,51 ± 0,63 a	4,94 ± 1,45
Linhaça	0,60 ± 0,40 b	5,60 ± 2,07
Glicerol	0,76 ± 0,78 b	0,83 ± 0,73
Soja	4,30 ± 0,20 a	5,83 ± 0,53

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$).

2.1.3. Influência de diferentes fontes de nitrogênio

A fonte de nitrogênio é um fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas lipolíticas. Tanto o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico apresentam um importante papel na síntese da enzima (TAN et al., 2003). Dentre os compostos nitrogenados usados para produção de lipase, as fontes de nitrogênio mais comuns empregadas têm sido: hidrolisados ácidos de proteínas, extratos de levedura, água de maceração de milho (milhocina), farinha de soja, hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas), aminoácidos, ureia, nitrato e sais de amônia (GHORBEL et al., 2005; TREICHEL et al., 2010).

O extrato de levedura é comumente adicionado ao meio de cultura como fonte de nitrogênio para a produção de lipases. Este nutriente fornece além de nitrogênio orgânico, na forma de peptídeos e aminoácidos, vitaminas e alguns carboidratos, sendo de composição bastante complexa e rica, o que é importante para o crescimento do micro-organismo, mas pode dificultar etapas posteriores de recuperação e purificação de produtos extracelulares. O custo do extrato de levedura também é elevado, tornando importante a busca de substitutos de menor valor, como sais inorgânicos.

O meio de fermentação inicialmente utilizado como padrão, composto de extrato de levedura, óleo de milho e Triton X-100, foi o que propiciou os maiores valores de atividade enzimática (3,16 U/mL) em relação aos demais cultivos realizados com fontes inorgânicas de nitrogênio (Tabela I.16). Dentre os sais inorgânicos testados, os melhores resultados foram obtidos com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,51 U/mL), representando aproximadamente 80% da maior atividade obtida com o meio contendo extrato de levedura. Esse resultado é bastante significativo, dadas as vantagens de custo e facilidade na recuperação e purificação da enzima. Embora as fontes orgânicas sejam frequentemente citadas na literatura para a produção de lipases, bons resultados com fontes inorgânicas são escassos. Ainda assim, Lima et al. (2004) relataram a obtenção de atividade lipolítica de 39,3 U/mL por *Penicillium aurantiogriseum*, em cultivo utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Tabela I.16: Atividade lipolítica dos meios fermentativos contendo diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de nitrogênio	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
Extrato de levedura (20 g/L)	2,89 ± 1,06 a	3,81 ± 2,29
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (4,3 g/L)	0,17 ± 0,06 b	7,03 ± 4,48
NaNO_3 (12 g/L)	1,58 ± 0,62 c	7,33 ± 0,94
NH_4NO_3 (5,7 g/L)	0,75 ± 0,44 bc	6,91 ± 1,16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (9,4 g/L)	2,52 ± 0,11 a	4,94 ± 1,45

*Médias seguidas de pelo menos uma letra igual indicam diferenças não significativas ($p > 0,05$)

Não foram verificadas atividades expressivas com ureia $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ como fonte de nitrogênio (0,17 U/mL). Em experimentos realizados com outros micro-organismos e condições de cultivo semelhantes, a ureia foi utilizada como fonte de nitrogênio orgânica e proporcionou aumento na produção de lipase do fungo *Rhodotorula glutinis* (PAPAPARASKEVAS et al., 1992; KUMAR et al., 2005). Por outro lado, a ureia também promoveu a inibição na produção da enzima de *Cryptococcus* sp. (KAMINI et al., 2000).

Extrato de levedura e sulfato de amônio em meio de Vogel demonstraram ser fontes de nitrogênio que garantem a produção de lipase com boa atividade enzimática, não apresentando diferença estatística. Considerando o menor custo

do sulfato de amônio e a complexidade de nutrientes do extrato de levedura, uma combinação entre as duas fontes foi avaliada posteriormente neste trabalho, como descrito no item 2.1.4.

2.1.4. Otimização da produção da enzima em fermentação submersa utilizando as melhores fontes de carbono e nitrogênio

De acordo com os experimentos anteriores (2.1.2 e 2.1.3) foram definidas as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção de lipase pelo fungo *F. oxysporum* de acordo com a maior produção da enzima e menor custo. Sendo assim, duas fontes de carbono foram estudadas nesta etapa, óleo de crambe, pelo apelo econômico da implantação desta cultura no Brasil, além de consistir de óleo não alimentício; e gordura de frango, por se tratar de descarte de baixo custo da indústria e poder gerar problemas ambientais. Desta forma dois delineamentos foram executados, um para cada fonte lipídica.

A melhor fonte de nitrogênio escolhida foi sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, por se tratar de fonte inorgânica, de baixo custo e proporcionar alta atividade enzimática. Também foi estudada a adição de níveis reduzidos de extrato de levedura, não mais como fonte de nitrogênio, mas pela sua composição rica, com vitaminas e alguns carboidratos. Como surfactante foi estudado a adição de Triton X-100 que, em ensaios anteriores, demonstrou capacidade de induzir a produção da lipase *F. oxysporum*.

2.1.4.1. Primeiro planejamento experimental (gordura de frango)

Um DCCR 2⁴ foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: concentração de gordura de frango (X1), tensoativo Triton X-100 (X2), sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X3) e extrato de levedura (X4). O tempo (72 h) e a temperatura de fermentação (28 °C) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da velocidade da agitação orbital de 180 rpm.

A tabela I.17 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (U/mL), atividade enzimática específica (U/mg) e biomassa (g/L) após o processo fermentativo. Neste estudo as maiores atividades lipolíticas foram observadas nos ensaios 14 e 24, com 8,33 e 8,04 U/mL, respectivamente. A estimativa dos efeitos

principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na tabela I.18, onde se observou também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância.

Tabela I.17: Matriz do DCCR 2⁴ contendo quatro repetições do ponto central após 72 h de fermentação com *Fusarium oxysporum*.

Ensaio	X1	X2	X3	X4	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	2,37	26,81	11,56
2	-1	-1	-1	+1	3,07	22,66	12,04
3	-1	-1	+1	-1	0,93	2,18	13,60
4	-1	-1	+1	+1	4,37	15,88	11,76
5	-1	+1	-1	-1	4,39	11,09	12,54
6	-1	+1	-1	+1	6,87	10,25	8,94
7	-1	+1	+1	-1	5,24	8,54	13,12
8	-1	+1	+1	+1	5,81	9,38	11,44
9	+1	-1	-1	-1	3,18	16,00	16,36
10	+1	-1	-1	+1	5,17	28,59	17,50
11	+1	-1	+1	-1	4,01	14,39	14,64
12	+1	-1	+1	+1	6,13	17,11	14,32
13	+1	+1	-1	-1	6,01	14,10	11,34
14	+1	+1	-1	+1	8,33	16,75	18,26
15	+1	+1	+1	-1	0,72	0,85	21,38
16	+1	+1	+1	+1	0,91	0,91	20,66
17	-α	0	0	0	3,35	14,50	7,52
18	+α	0	0	0	0,39	1,30	20,60
19	0	-α	0	0	0,13	1,57	18,78
20	0	+α	0	0	7,13	6,21	14,56
21	0	0	-α	0	4,50	15,73	12,36
22	0	0	+α	0	0,57	0,94	20,62
23	0	0	0	-α	0,73	0,84	13,90
24	0	0	0	+α	8,04	23,03	13,76
25	0	0	0	0	5,95	15,14	14,78
26	0	0	0	0	4,89	14,71	14,22
27	0	0	0	0	1,80	1,94	15,42
28	0	0	0	0	1,45	1,71	15,78

X1: Gordura de frango; X2: Triton X-100; X3: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; X4: Extrato de levedura. $\alpha = 2,0$.

Tabela I.18: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de *Fusarium oxysporum* para o DCCR 2⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), (NH₄)₂SO₄ (X3) e extrato de levedura (X4).

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficientes de regressão
Intercepto	5,19750	0,885466	0,000055	5,197500
X1 (L)	-0,37500	0,722980	0,612695	-0,187500
X1 (Q)	-1,29250	0,722980	0,097140	-0,646250
X2 (L)	1,92000	0,722980	0,019797	0,960000
X2 (Q)	-0,41250	0,722980	0,578030	-0,206250
X3 (L)	-1,59500	0,722980	0,045975	-0,797500
X3 (Q)	-0,96000	0,722980	0,207076	-0,480000
X4 (L)	2,36833	0,722980	0,006022	1,184167
X4 (Q)	-0,03500	0,722980	0,962125	-0,017500
X1 x X2	-1,76000	0,885466	0,068333	-0,880000
X1 x X3	-1,32000	0,885466	0,159890	-0,660000
X1 x X4	-0,07000	0,885466	0,938193	-0,035000
X2 x X3	-1,82250	0,885466	0,060195	-0,911250
X2 x X4	-0,33750	0,885466	0,709245	-0,168750
X3 x X4	-0,14750	0,885466	0,870264	-0,073750

A partir da análise dos efeitos (Tabela I.18), é possível observar que não houve interação entre as variáveis estudadas em um limite de confiança de $p < 0,05$. No entanto, as variáveis X2, X3 e X4, isoladas, foram estatisticamente significativas. Assim, as concentrações de X2 (Triton X-100) e X4 (extrato de levedura) possuem influência positiva na resposta, aumentando estas variáveis haverá um aumento no valor da atividade enzimática, causando acréscimo médio de atividade de 1,92 e 2,37 U/mL, respectivamente. Por outro lado, o aumento da concentração de X3 (sulfato de amônio) possui efeito negativo na resposta, causando decréscimo médio de 1,59 U/mL quando se passa do nível (-) para nível (+), respectivamente..

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura I.11), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado. Observa-se que as variáveis X2 e X4 possuem influência positiva na resposta, enquanto X3 possui influência negativa.

Pelo teste F, foi possível verificar que, para as variáveis estudadas, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ (Tabela I.19), portanto o modelo linear proposto é válido. Pode-se então elaborar um modelo matemático da atividade enzimática (Equação I.4).

$$U/mL = 5,1975 - 0,1875.(X1) - 0,6462.(X1)^2 + 0,9600.(X2) - 0,2062.(X2)^2 - 0,7975.(X3) - 0,4800.(X3)^2 + 1,1841.(X4) - 0,0175.(X4)^2 - 0,8800.(X1.X2) - 0,6600.(X1.X3) - 0,0350.(X1.X4) - 0,9112.(X2.X3) - 0,1687.(X2.X4) - 0,0737.(X3.X4) \quad (I.4)$$

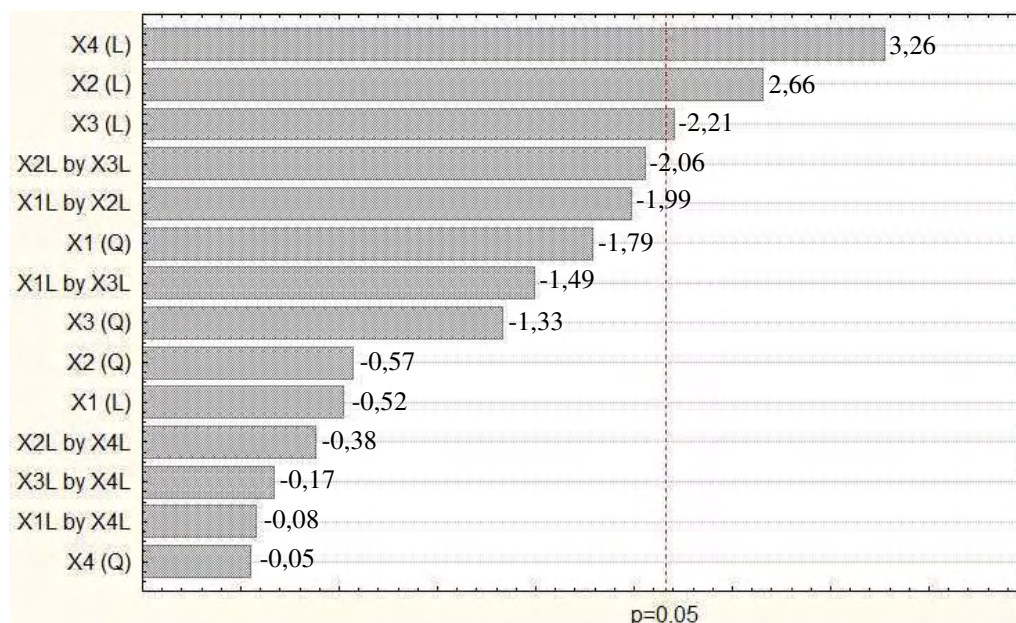


Figura I.11: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2⁴ utilizando gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).

Tabela I.19: Análise de variância obtida para o DCCR 2⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	F _{calc}	p-Valor
X1 (L)	0,8438	1	0,84375	0,26904	0,612695
X1 (Q)	10,0233	1	10,02334	3,19601	0,097140
X2 (L)	22,1184	1	22,11840	7,05261	0,019797
X2 (Q)	1,0209	1	1,02094	0,32553	0,578030
X3 (L)	15,2642	1	15,26415	4,86708	0,045975
X3 (Q)	5,5296	1	5,52960	1,76315	0,207076
X4 (L)	33,6540	1	33,65402	10,73082	0,006022
X4 (Q)	0,0074	1	0,00735	0,00234	0,962125
X1 x X2	12,3904	1	12,39040	3,95077	0,068333
X1 x X3	6,9696	1	6,96960	2,22231	0,159890
X1 x X4	0,0196	1	0,01960	0,00625	0,938193
X2 x X3	13,2860	1	13,28603	4,23634	0,060195
X2 x X4	0,4556	1	0,45562	0,14528	0,709245
X3 x X4	0,0870	1	0,08703	0,02775	0,870264
Resíduo	40,7706	13	3,13620	-	-
Total	159,6361	27	-	-	-

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: quadrado médio. R² = 0,745; R = 0,863. F_{tab} (1;13;0,05) = 4,67.

Os valores previstos e experimentais para a atividade enzimática (U/mL) estão apresentados na Figura I.12.

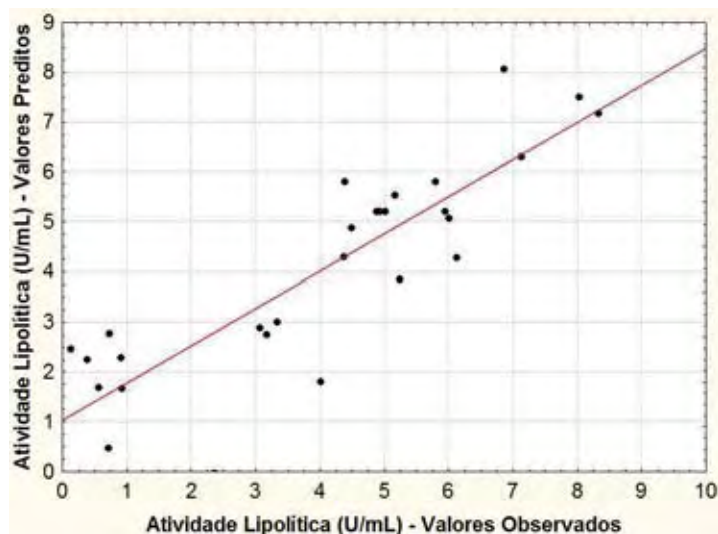


Figura I.12: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).

As superfícies de resposta (MSR) e as curvas de contorno obtidas para os modelos lineares são apresentadas nos gráficos da figura I.13. Como mencionado anteriormente, conforme as concentrações de Triton X-100 (X2) e extrato de levedura (X4) vão aumentando a atividade enzimática tende a também aumentar, os maiores valores de atividade são obtidos na região onde há as maiores concentrações de X2 e X4. Com relação à concentração de sulfato de amônio (X3) a resposta é inversa, conforme se aumenta a concentração da fonte de nitrogênio a atividade enzimática diminui.

O modelo apresentado foi satisfatório, pois demonstra a importância das variáveis estudadas bem como sua melhor concentração. Para as variáveis extrato de levedura (X4) e Triton X-100 (X2) as MSR demonstram uma tendência a continuar aumentando a resposta com o aumento de suas concentrações, porém isto traria prejuízo econômico pois são componentes do meio de fermentação de alto valor, além das dificuldades já discutidas em utilizar grandes quantidades de tensoativo.

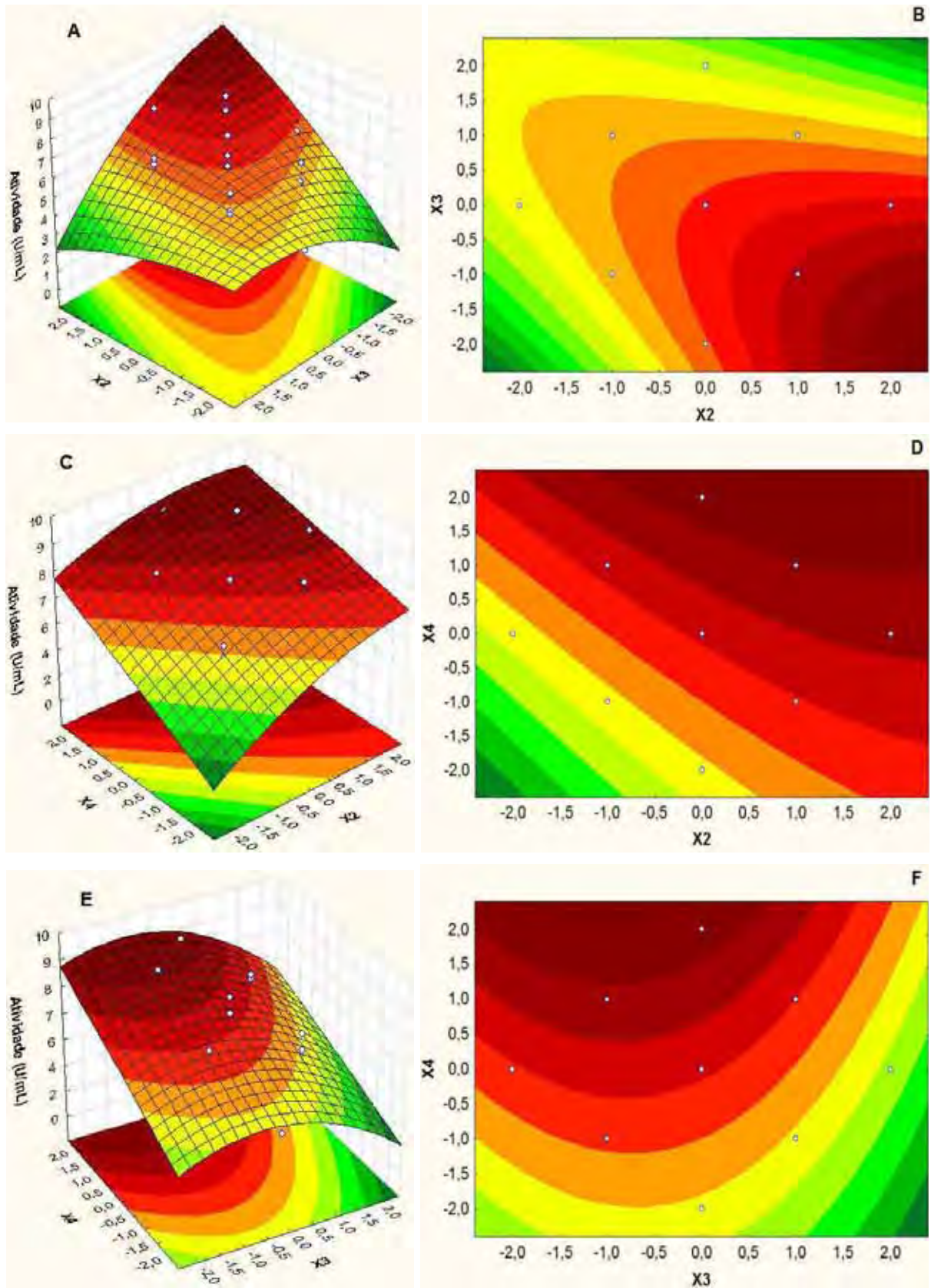


Figura 1.13: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/mL) em função de X2 e X3 (A) e (B), X2 e X4 (C) e (D) e X3 e X4 (E) e (F). X1: Gordura de frango; X2: Triton X-100; X3: Sulfato de amônio e X4: Extrato de levedura.

Assim, por meio do estudo das MSR foi definida como região de melhor resposta a composta pela seguinte combinação das variáveis: gordura de frango 1,5% (v/v), Triton X-100 1,5% (m/v), sulfato de amônio 0,45% (m/v) e extrato de levedura 0,1% (m/v), com valor previsto de atividade enzimática de $9,11 \pm 5,0$ U/mL. A validação realizada de acordo com as concentrações descritas foi abaixo do esperado, porém dentro da margem de erro descrita pelo modelo apresentando atividade enzimática de $4,22 \pm 0,35$ U/mL (Tabela I.20).

Tabela I.20: Validação para melhor resultado do DCCR 2^4 com gordura de frango (1,5%, v/v), Triton X-100 (1,5, m/v), sulfato de amônio (0,45%, m/v) e extrato de levedura (0,1%, m/v).

Atividade enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
$4,22 \pm 0,35$	$0,45 \pm 0,063$	$9,38 \pm 1,31$	$10,93 \pm 1,22$

2.1.4.2. Segundo planejamento experimental (óleo de crambe)

Um segundo DCCR 2^4 foi utilizado para avaliar as variáveis do processo adotadas neste experimento: concentração de óleo de crambe (X1), Tensoativo Triton X-100 (X2), Sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (X3), e extrato de levedura (X4). O tempo (72 h) e a temperatura de fermentação (28 °C) foram os parâmetros fixos deste planejamento, além da velocidade da agitação orbital de 180 rpm.

A tabela I.21 apresenta a matriz do planejamento, com as variáveis nas suas formas codificadas, e os resultados obtidos de atividade enzimática (U/mL), atividade enzimática específica (U/mg) e biomassa (g/L) após o processo fermentativo. Neste estudo as maiores atividades lipolíticas foram observadas nos ensaios 18 e 24, com 2,66 e 2,51 U/mL, respectivamente. A estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis para o planejamento é apresentada na tabela I.22, onde se observou também os valores obtidos para o erro padrão, p-valor, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 e o nível de significância.

Tabela I.21: Matriz do DCCR 2⁴ contendo quatro repetições do ponto central após 72 h de fermentação com *Fusarium oxysporum*.

Ensaio	X1	X2	X1	X2	Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	0,86	7,69	5,14
2	-1	-1	-1	+1	1,76	10,95	5,73
3	-1	-1	+1	-1	0,96	1,24	6,04
4	-1	-1	+1	+1	0,91	2,31	5,87
5	-1	+1	-1	-1	0,52	0,32	6,17
6	-1	+1	-1	+1	1,55	1,31	6,41
7	-1	+1	+1	-1	1,63	1,66	6,32
8	-1	+1	+1	+1	2,29	1,70	6,68
9	+1	-1	-1	-1	1,78	6,94	8,50
10	+1	-1	-1	+1	1,89	8,45	9,76
11	+1	-1	+1	-1	1,25	2,48	9,56
12	+1	-1	+1	+1	2,18	4,08	9,53
13	+1	+1	-1	-1	1,85	2,34	6,86
14	+1	+1	-1	+1	2,39	2,80	10,19
15	+1	+1	+1	-1	1,11	1,01	8,65
16	+1	+1	+1	+1	1,42	0,82	7,72
17	-α	0	0	0	0,42	0,83	3,73
18	+α	0	0	0	2,66	5,88	11,18
19	0	-α	0	0	0,30	1,55	5,61
20	0	+α	0	0	1,52	1,12	7,30
21	0	0	-α	0	2,03	4,11	8,19
22	0	0	+α	0	1,62	1,65	8,61
23	0	0	0	-α	0,66	0,76	7,06
24	0	0	0	+α	2,51	5,19	8,58
25	0	0	0	0	1,61	1,10	8,45
26	0	0	0	0	1,76	1,30	8,19
27	0	0	0	0	1,25	1,15	7,70
28	0	0	0	0	1,39	1,23	8,14

X1: óleo de crame; X2: Triton X-100; X3: (NH₄)₂SO₄; X4: Extrato de levedura. α = 2,0.

Tabela I.22: Estimativa dos efeitos para atividade enzimática (U/mL) da lipase de *Fusarium oxysporum* para o DCCR 2⁴ com óleo de crambe (X1), Triton X-100 (X2), (NH₄)₂SO₄ (X3) e extrato de levedura (X4).

Variável	Efeito	Erro padrão	p-valor	Coefficientes de regressão
Intercepto	1,502222	0,231900	0,000021	1,502222
X1 (L)	0,655000	0,189346	0,004232	0,327500
X1 (Q)	0,037361	0,189346	0,846631	0,018681
X2 (L)	0,302222	0,189346	0,134470	0,151111
X2 (Q)	-0,277083	0,189346	0,167121	-0,138542
X3 (L)	-0,138519	0,189346	0,477416	-0,069259
X3 (Q)	0,181528	0,189346	0,355196	0,090764
X4 (L)	0,678333	0,189346	0,003342	0,339167
X4 (Q)	0,059306	0,189346	0,759087	0,029653
X1 x X2	-0,229444	0,231900	0,340521	-0,114722
X1 x X3	-0,379722	0,231900	0,125505	-0,189861
X1 x X4	-0,080000	0,231900	0,735630	-0,040000
X2 x X3	0,140556	0,231900	0,554882	0,070278
X2 x X4	0,080833	0,231900	0,732993	0,040417
X3 x X4	-0,090556	0,231900	0,702495	-0,045278

A partir da análise dos efeitos (Tabela I.22), é possível observar que não houve interação entre as variáveis estudadas em um limite de confiança de $p < 0,05$. No entanto, as variáveis X1 e X4, isoladas, foram estatisticamente significativas. Assim, as concentrações dessas variáveis, óleo de crambe (X1) e extrato de levedura (X4) possuem influência positiva na resposta, aumentando estas variáveis haverá um aumento no valor da atividade enzimática, causando acréscimo médio de atividade de 0,65 e 0,68 U/mL, respectivamente. Por outro lado, as demais variáveis, Triton X-100 (X2) e sulfato de amônio (X3), não apresentaram efeito significativo na resposta.

Isto também pode ser verificado no Gráfico de Pareto (Figura I.14), que representa a razão entre o valor estimado do efeito e seu erro padrão, e constitui o valor do efeito padronizado. Observa-se que as variáveis X1 e X4 possuem influência positiva na resposta.

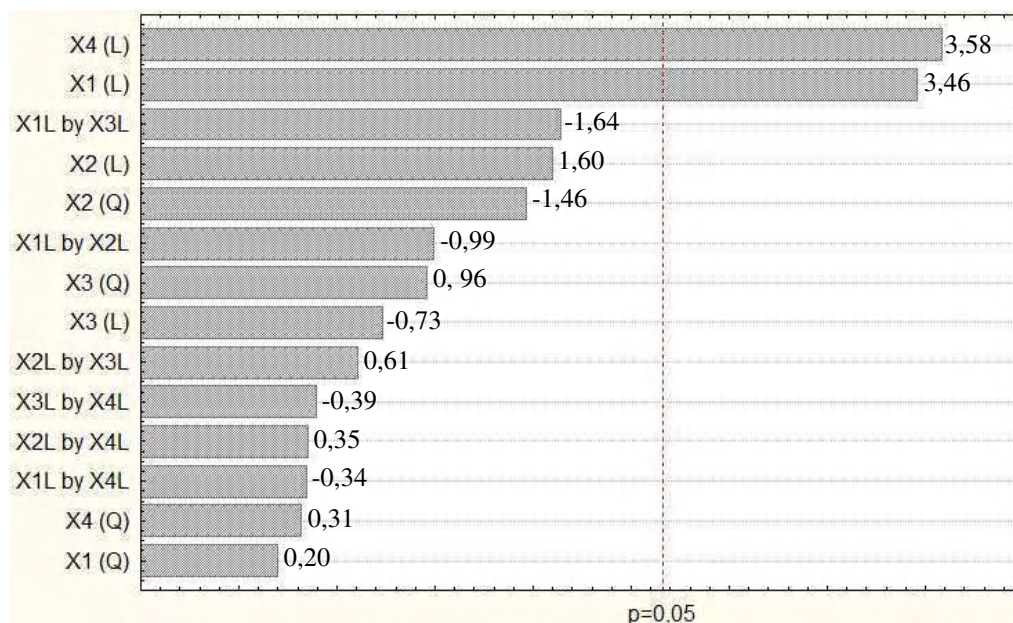


Figura I.14: Gráfico de Pareto para o modelo obtido do DCCR 2⁴ utilizando óleo de crambe (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).

Os valores previstos e experimentais para a atividade enzimática (U/mL) estão apresentados na Figura I.15.

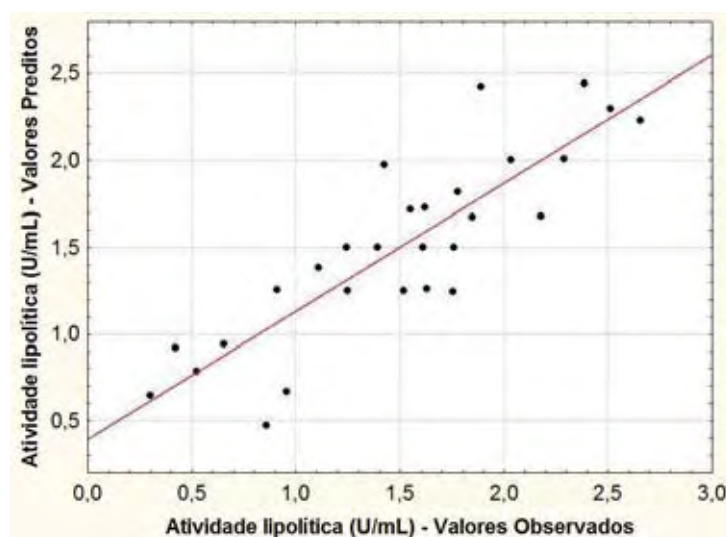


Figura I.15: Relação entre valores observados e previstos para atividade enzimática (U/mL).

Pelo teste F, foi possível verificar que, para as variáveis estudadas, $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ (Tabela I.23), portanto o modelo proposto é válido. Pode-se então escrever empiricamente os modelos matemáticos da atividade enzimática (Equação I.5).

$$U/mL = 1,5022 + 0,3275.(X1) + 0,0186.(X1)^2 + 0,1511.(X2) - 0,1385.(X2)^2 - 0,0692.(X3) + 0,0907.(X3)^2 + 0,3391.(X4) + 0,0296.(X4)^2 - 0,1147.(X1.X2) - 0,1898.(X1.X3) - 0,0400.(X1.X4) + 0,0702.(X2.X3) + 0,0404.(X2.X4) - 0,0452.(X3.X4) \quad (I.5)$$

Tabela I.23: Análise de variância obtida para o DCCR 2⁴ com gordura de frango (X1), Triton X-100 (X2), sulfato de amônio (X3) e extrato de levedura (X4).

Fontes de variação	SQ	gl	MQ	Fcalc	p-Valor
X1 (L)	2,57415	1	2,574150	11,96663	0,004232
X1 (Q)	0,00838	1	0,008375	0,03893	0,846631
X2 (L)	0,54803	1	0,548030	2,54766	0,134470
X2 (Q)	0,46065	1	0,460651	2,14146	0,167121
X3 (L)	0,11512	1	0,115124	0,53519	0,477416
X3 (Q)	0,19771	1	0,197714	0,91913	0,355196
X4 (L)	2,76082	1	2,760817	12,83440	0,003342
X4 (Q)	0,02110	1	0,021103	0,09810	0,759087
X1 x X2	0,21058	1	0,210579	0,97893	0,340521
X1 x X3	0,57676	1	0,576756	2,68120	0,125505
X1 x X4	0,02560	1	0,025600	0,11901	0,735630
X2 x X3	0,07902	1	0,079023	0,36736	0,554882
X2 x X4	0,02614	1	0,026136	0,12150	0,732993
X3 x X4	0,03280	1	0,032801	0,15249	0,702495
Resíduo	2,79644	13	0,215111	-	-
Total	10,66258	27	-	-	-

SQ: Soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: quadrado médio. $R^2 = 0,738$; $R = 0,859$. $F_{\text{tab}}(1;13;0,05) = 4,67$.

As superfícies de resposta (MSR) obtidas para os modelos lineares são apresentadas nos gráficos da figura I.16. Como mencionado anteriormente, conforme as concentrações de óleo de crambe (X1) e extrato de levedura (X4) vão aumentando a atividade enzimática tende a também aumentar, os maiores valores de atividade são obtidos na região onde há as maiores concentrações de X1 e X4.

Para as variáveis óleo de crambe (X1) e extrato de levedura (X4) as MSR demonstram uma tendência a continuar aumentando a resposta com o aumento de suas concentrações, porém isto traria prejuízo econômico no caso de X4, pois este é um componente do meio de fermentação de alto valor. Uma concentração muito alta de óleo de crambe poderia resultar em complicações como alteração da aeração do meio de cultivo e alterar o metabolismo e a síntese de lipase.

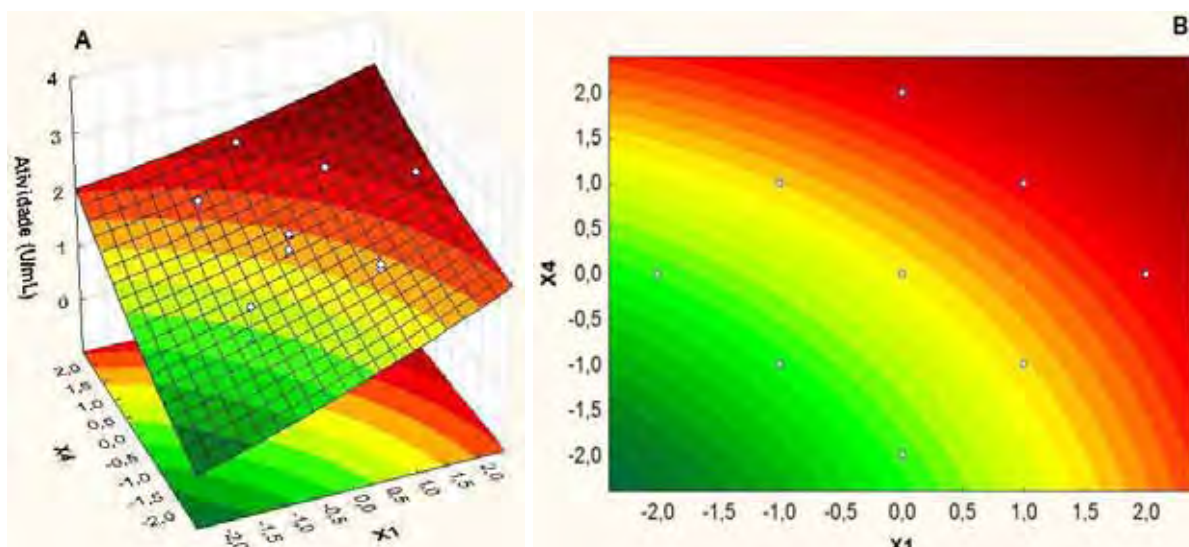


Figura 1.16: Superfícies de resposta e curvas de contorno para a atividade enzimática (U/mL) em função de X1 e X4 (A) e (B). X1: Óleo de crambe; X4: Extrato de levedura.

Assim, por meio do estudo das MSR foi definida como região de melhor resposta a composta pela seguinte combinação das variáveis: óleo de crambe 1,75% (v/v), Triton X-100 0,5% (m/v), sulfato de amônio 0,1% (m/v) e extrato de levedura 0,1% (m/v), com valor previsto de atividade enzimática de $5,03 \pm 3,3 \text{ U/mL}$. A validação realizada de acordo com as concentrações descritas foi abaixo do esperado, porém dentro da margem de erro descrita pelo modelo apresentando atividade enzimática de $2,77 \pm 0,22 \text{ U/mL}$ (Tabela 1.24).

Tabela 1.24: Validação para melhor resultado do DCCR 2⁴ com óleo de crambe (1,75%; v/v), Triton X-100 (0,5%; m/v), sulfato de amônio (0,1%; m/v) e extrato de levedura (0,1%; m/v).

Atividade enzimática (U/mL)	Proteínas totais (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
$2,77 \pm 0,22$	$0,11 \pm 0,026$	$25,18 \pm 5,95$	$8,99 \pm 0,60$

2.1.5. Influência dos sais de Vogel na produção da lipase de *Fusarium oxysporum*

Os ensaios de delineamento fatorial, tanto com óleo de crambe quanto com gordura de frango, foram realizados com a adição de solução de sais de Vogel (1956). Considerando que a solução de Vogel apresenta composição bastante rica,

contendo não apenas sais, mas também vitaminas, a necessidade da adição dessa solução foi investigada, uma vez que a composição do meio de cultivo otimizado contava com extrato de levedura, que tem composição bastante complexa e rica em nutrientes, incluindo aminoácidos e vitaminas.

Para isso, nos experimentos sem adição de sais os meios foram compostos por:

- Meio A (1,75% (v/v) de óleo de crambe, 0,5% (m/v) de sulfato de amônio, 0,1% (m/v) de extrato de levedura e 0,5% (m/v) de Triton X-100 em água destilada);
- Meio B (1,5% (v/v) de gordura de frango, 0,45% (m/v) de sulfato de amônio, 0,1% de extrato de levedura e 1,5% de Triton X-100 em água destilada).

Ambos os experimentos foram realizados a 28 °C e 180 rpm. Os resultados estão apresentados na tabela I.25.

Tabela I.25: Lipase produzida pelo fungo *Fusarium oxysporum* em meio de fermentação sem complementação de sais de Vogel.

Meio de fermentação	Atividade enzimática (U/mL)
Meio A – óleo de crambe	2,71 ± 0,45
Meio B – gordura de frango	0,35 ± 0,10

A produção da lipase com gordura de frango caiu de 4,22 para 0,35 U/mL quando o meio fermentativo deixou de utilizar a solução de sais de Vogel, mostrando que apesar de induzir a produção da enzima o substrato não fornece os nutrientes necessários para o crescimento do micro-organismo, nem a quantidade de extrato de levedura adicionada é suficiente para isso.

Por outro lado, na presença de óleo de crambe a atividade enzimática se manteve a mesma (2,71 U/mL), mostrando que a adição de sais de Vogel neste caso era desnecessária, o que contribui também para a redução de custo na produção da enzima. Os resultados obtidos com óleo de crambe são bastante interessantes dadas as características da cultura e do óleo. O óleo de crambe se diferencia das demais fontes de carbono utilizadas pelo alto conteúdo de ácido erúico (22:1) (Tabela I.14) e por não requerer refinamento, sendo usado diretamente na fermentação. A possibilidade de produção de lipase utilizando óleo de crambe é inédita na literatura até o momento e representa mais um atrativo no cultivo da planta para a agroindústria brasileira, além de possibilitar a integração da

produção de lipases e produção agroindustrial de oleaginosas sem concorrer com a produção de alimentos.

2.1.6. Considerações gerais

Nos ensaios de investigação de melhor fonte de carbono para a fermentação do fungo *F. oxysporum*, a gordura de frango e o óleo de crambe apresentaram média de produção enzimática estatisticamente igual (Tabela I.15). Porém, após a realização dos DCCR, com o estudo em conjunto de outras variáveis (Triton X-100, sulfato de amônio e extrato de levedura), foi possível observar que o cultivo com óleo de crambe apresentou atividade enzimática 40% inferior à apresentada com o cultivo otimizado com gordura de frango.

Desta forma fica evidente a importância do delineamento experimental realizado para melhor compreensão da produção da lipase pelo fungo *Fusarium oxysporum*, possibilitando o aumento da atividade enzimática, o que não seria possível com ensaios tradicionais.

Apesar de não haver dados na literatura para produção de lipase de *F. oxysporum* utilizando Delineamento Fatorial e Metodologia de Superfície de Resposta, a utilização dessas ferramentas para a produção de lipases já se mostrou eficiente para a produção dessa enzima por diferentes micro-organismos. Com *Aspergillus terreus* (KAUSHIK et al., 2010), observou-se aumento de 190% na produção de lipase em comparação ao estudo das variáveis isoladas. Pio e Macedo (2007), otimizaram a produção de cutinase por *F. oxysporum* obtendo o dobro de produção da enzima. Liu, Lu e Chang (2006), foram capazes de otimizar o meio de fermentação e aumentar em 375% a produção da lipase de *Burkholderia* sp. C20, de 0,8 para 4,9 U/mL. Estas ferramentas estatísticas também foram utilizadas para estudar a influência da fonte de carbono e das concentrações de fonte de nitrogênio sobre a produção de lipase por *Geotrichum* sp., resultando em aumento de 53% na atividade lipolítica (BURKERT, MAUGERI e RODRIGUES, 2004). Wang, Xu e Shan (2008) aumentaram em 61,5% a produção de lipase por *Rhizopus chinensis*. Os dados da literatura sugerem que estas ferramentas estatísticas são úteis para a otimização da produção enzimática com aumento significativo na resposta.

Estudos sobre produção de lipase por fungos do gênero *Fusarium* têm relatado valores de atividade bastante variáveis dependendo da cepa e das condições de

cultivo utilizadas, como demonstrado da Tabela I.25. São descritas na literatura atividades lipolíticas variando de 1,03 U/mL (TAMERLER E KESHAVARZ, 2000) até 17,0 U/mL (RIFAAT et al., 2010). A cepa de *F. oxysporum*, isolada por nosso grupo de pesquisa e utilizada neste trabalho, proporcionou atividade enzimática (Tabela I.26) menor em relação aos maiores valores citados na literatura, entretanto, nestes casos o meio de cultivo era composto de óleos alimentares (oliva, milho), além de alto conteúdo de fonte de nitrogênio orgânica e complexa (3% de peptona), ao contrário do presente trabalho, no qual o cultivo foi otimizado com fontes de carbono não alimentícias ou resíduo industrial e fonte de nitrogênio complexa em baixa concentração (0,01% de extrato de levedura).

Rifaat et al. (2010) manteve alta atividade enzimática com a substituição da fonte orgânica de nitrogênio por nitrato de sódio, porém utilizando óleo de oliva como indutor. Por outro lado, Quadros et al. (2007) utilizou óleo de descarte de fritura e água de maceração de milho para produção da lipase por *F. oxysporum* mantendo atividade enzimática mediana (5 U/mL) e, assim como no presente trabalho, o custo de produção da enzima caiu consideravelmente.

Tabela I.26: Atividade lipolítica e condições de cultivo de diferentes cepas de *Fusarium*.

Micro-organismo	Substrato indutor	Fonte de nitrogênio	Atividade (U/mL)	Tempo de cultivo (h)	Referência
<i>F. oxysporum</i>	1,25% (v/v) óleo de colza	1% (m/v) peptona	1,03	96	Tamerler e Keshavarz (2000)
<i>Fusarium</i> sp. YM-30	1% (v/v) mono-oleína	1% (m/v) polipeptona	1,19	120	Mase, Matsumiya e Akiba (1995)
<i>F. oxysporum</i> AM3	1,5% (v/v) trioleína	0,6% (m/v) nitrato de sódio	1,60	72	Camargo-de-Morais et al. (2003)
<i>F. oxysporum</i> 152B	1% (v/v) óleo de fritura	8% (v/v) água de maceração de milho	5,00	72	Quadros et. al. (2007)
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de oliva	3% (m/v) peptona	17,00	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de coco	3% (m/v) peptona	14,60	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de milho	3% (m/v) peptona	14,00	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de girassol	3% (m/v) peptona	13,50	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	1,5% (v/v) óleo de soja	3% (m/v) peptona	11,90	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	2,0% (v/v) óleo de oliva	3% (m/v) nitrato de sódio	14,00	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i>	2,0% (v/v) óleo de oliva	3% (m/v) peptona	17,00	120	Rifaat et al. (2010)
<i>F. oxysporum</i> FCLA MA41	1,79% (v/v) óleo de milho	0,5% (m/v) extrato de levedura	8,30	72	Oliveira (2009)
<i>F. oxysporum</i> FCLA MA41	1,5% (v/v) gordura de frango	0,45% (m/v) sulfato de amônio	4,22	72	Presente trabalho
<i>F. oxysporum</i> FCLA MA41	1,75% (v/v) óleo de crambe	0,5% (m/v) sulfato de amônio	2,77	72	Presente trabalho

Considerando os dados obtidos no presente estudo, o meio de cultivo que proporcionou melhor atividade volumétrica foi o meio de fermentação contendo óleo de milho e extrato de levedura, com o dobro da atividade em relação aos cultivos com gordura de frango e sulfato de amônio em meio de Vogel (Tabela I.26). Por outro lado, o custo do meio de cultivo com maior atividade é também o mais elevado, como pode ser observado na tabela I.27.

Ao analisar a relação de produção/custo de cada meio, em uma razão de U/R\$, verifica-se que o meio otimizado com gordura de frango é o menos rentável. Isso por que apesar de utilizar como indutor na produção da lipase um subproduto da indústria granjeira, apresenta maior quantidade de tensoativo Triton X-100 (1,5%, m/v), quando comparado com os meios contendo óleo de crambe (0,5%).

O meio de cultura contendo óleo de crambe, apesar de apresentar as menores atividades volumétricas, foi o que apresentou melhor índice de produção/custo. Esse fato se deve a utilização de óleo de origem não alimentícia e de alta produtividade agrícola com preço reduzido de R\$1,20/L (PITOL, 2007), fonte de nitrogênio inorgânica (sulfato de amônio) e apenas pequena quantidade de extrato de levedura (0,1%). Além disso, o grande diferencial é baixa necessidade de tensoativo (0,5%) e a completa ausência de sais, demonstrando a vantagem econômica e metabólica do óleo de crambe.

Tabela I.27: Estimativa de custos para a produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em 72 h nos diversos meios de cultura estudados.

Meio de fermentação	Preço do meio (R\$/L)	Atividade (U/L)	Produção/custo (U/R\$)
Meio padrão otimizado	2,18	8300	3807
Meio gordura de frango otimizado com Vogel	1,71	4220	2468
Meio óleo de crambe otimizado com Vogel	0,91	2770	3044
Meio óleo de crambe otimizado sem Vogel	0,63	2710	4302

CAPÍTULO II - IMOBILIZAÇÃO POR ENCAPSULAÇÃO E ADSORÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA POR *Fusarium oxysporum* EM DIFERENTES SUPORTES

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Produção da enzima em fermentação submersa

O meio de fermentação foi composto de óleo de milho 1,79% (m/v), tensoativo Triton X-100 1,79% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v), utilizando Erlenmeyers de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultura. O inóculo foi iniciado pela transferência de 3 discos de ágar e micélio de 0,25 cm² e o cultivo mantido por 72 h a 28 °C e 180 rpm. Após a fermentação o cultivo foi interrompido e o sobrenadante de fermentação filtrado para separação de células.

1.2. Estudos de imobilização

A imobilização da lipase de *F. oxysporum* FCLA MA41 foi estudada tanto por encapsulação (Polióxido de etileno e alginato de cálcio) quanto por adsorção (Celite[®] 545 e Octil Sepharose CL-4B).

Os resultados de imobilização foram acompanhados pela atividade de hidrólise e transesterificação do pNPP. Os controles foram enzima livre solúvel e enzima livre liofilizada.

1.2.1. Imobilização por encapsulação em filmes de polióxido de etileno (PEO)

Para a imobilização da enzima em PEO foi utilizado protocolo descrito por Nascimento et al. (2003). Em 20 mL de solução enzimática foram solubilizados 500 mg do polímero. A mistura homogeneizada foi mantida em placa de Petri aberta para evaporação da água à temperatura ambiente ou em estufa de ar forçado. Após a formação do filme, este foi cortado em pedaços de 1 cm² e avaliado quanto à capacidade de transesterificação utilizando pNPP como substrato. O volume de extrato bruto adicionado foi determinado a partir das dosagens de proteína e atividade enzimática. Foram testados valores de proteína entre 1 e 75 mg/mL. A

temperatura utilizada para a secagem do filme foi estudada no intervalo entre 25 e 80 °C.

1.2.2. Imobilização por encapsulação em alginato de cálcio

O protocolo para a imobilização em alginato de cálcio baseou-se no trabalho descrito por Cheirsilp, Jeamjounkhaw e Kittikun (2009). Em 5 mL de solução enzimática foi adicionado 5 mL de solução de alginato de maneira a se obter concentração de proteína entre 1 e 10 mg/mL e 2,5% (m/v) de alginato. A mistura homogeneizada foi gotejada sobre 150 mL de uma solução de cloreto de cálcio 0,02 mol/L com uma seringa. Após 20 minutos de contato, as esferas de alginato/enzima foram separadas por filtração. As esferas foram lavadas com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 7. As esferas de alginato/enzima, o filtrado e o tampão de lavagem foram analisados quanto à atividade hidrolítica e de transesterificação utilizando *p*NPP como substrato.

1.2.3. Imobilização por adsorção em Celite® 545

Para preparação da enzima imobilizada em Celite foi utilizada a metodologia descrita por Chang et al. (2006) com modificações. O extrato bruto foi primeiramente misturado em diferentes proporções a 1 g de Celite. Em seguida foi adicionado isopropanol a 4 °C (10 mL) e a mistura homogeneizada. A lipase imobilizada foi coletada por filtração e lavada duas vezes com n-hexano para remover a enzima não adsorvida. Os parâmetros estudados foram variação do tempo de imobilização (2 a 90 min), temperatura de imobilização (4 a 30 °C) e concentração de proteína (1 a 10 mg/mL) contida no extrato bruto adicionado ao suporte.

1.2.4. Imobilização por interação hidrofóbica em Octil-Sepharose CL-4B.

A imobilização da enzima em Octil-Sepharose CL-4B foi realizada segundo método descrito por Wei e Wu (2007). O extrato bruto foi misturado em 20 mL de Octil-Sepharose CL-4B pré-equilibrada com 20 mL de tampão fosfato (0,025 mol/L, pH 7,5) contendo 0,8 mol/L de sulfato de amônio, a mistura foi agitada com agitação intermitente e mantida a 4 °C. Após 4 h, a mistura resina/lipase foi lavada com tampão fosfato (0,025 mol/L, pH 7,5) até que a atividade não pudesse ser detectada

no sobrenadante. Foi estudada a variação do tempo de imobilização (0 a 4 h), temperatura de imobilização (4 a 30 °C) e concentração de proteína (1 a 10 mg/mL) contida no extrato bruto adicionado ao suporte.

1.2.5. Avaliação da imobilização

A eficiência de imobilização (E) e o rendimento de atividade (R) foram determinados a partir das equações abaixo (YADAV e JADHAV, 2005):

$$E = \frac{(AT_i - AT_f)}{AT_i} \times 100 \qquad R = \frac{A_0 \times 100}{AT}$$

AT_i = Atividade total inicial antes da imobilização (U).

AT_f = Atividade total inicial após a imobilização (U).

A₀ = Atividade do imobilizado (U/g de suporte).

AT = Atividade teórica do imobilizado (U/g de suporte).

1.3. Métodos analíticos

1.3.1. Atividade de transesterificação utilizando substrato sintético palmitato de p-nitrofenila.

A metodologia, baseada no método de Goujard e col. (2009), tem como principal objetivo verificar a atividade da enzima em reação de transesterificação. A metodologia utiliza 100 mg de lipase liofilizada ou imobilizada em 10 mL de solução de pNPP (0,001 mol/L em n-hexano), iniciando a reação com adição de 60 µL de metanol. O meio reacional foi incubado sob agitação de 200 rpm, 37 °C por 1 h. Após a reação, 1 mL da mistura foi adicionado a 1 mL de NaOH 0,1 mol/L e a fase aquosa lida a 412 nm contra um branco sem enzima. Uma unidade de atividade enzimática (UT) foi definida como a liberação de 1 µmol.min⁻¹.g⁻¹ de pNP.

1.3.2. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de p-nitrofenila

A atividade lipolítica das amostras foi mensurada a partir da hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (pNPP), método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima (2004). O método baseia-se na hidrólise do pNPP pela enzima em meio aquoso contendo como surfactante

Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, foi seguida de leitura em espectrofotômetro a 410 nm (Figura II.1). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 $\mu\text{mol/min.}$ de *p*NP. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($1,50 \times 10^4 \text{ mol.L/cm.min.}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

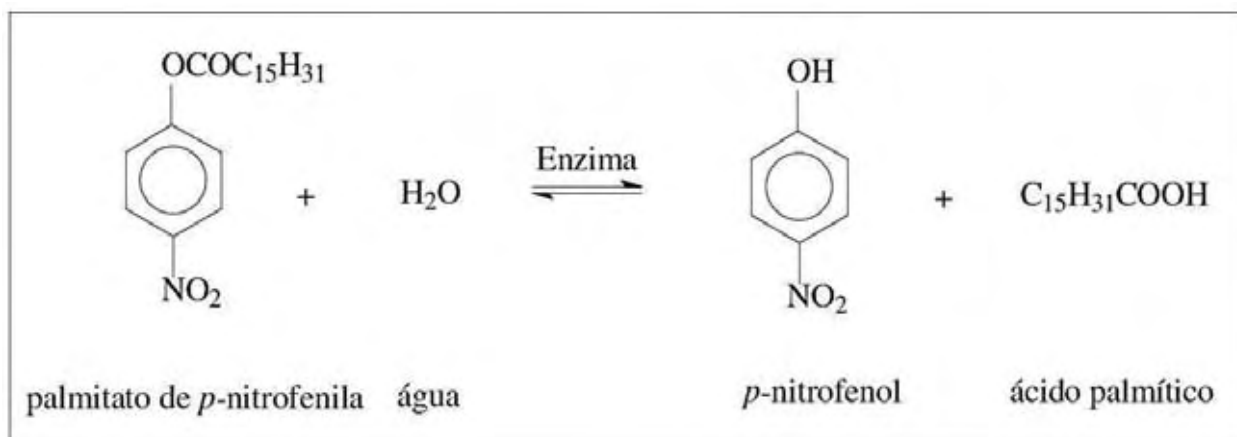


Figura II.1: Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

1.3.3. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas durante os cultivos e ensaios de imobilização foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Estudos de imobilização

A enzima foi produzida por fermentação submersa nas condições descritas e concentrada em sacarose durante 7 h. A atividade enzimática do extrato bruto e do extrato bruto concentrado está apresentada na Tabela II.1. A enzima concentrada foi utilizada para os estudos de imobilização.

Tabela II.1: Obtenção da lipase de *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa e concentração da enzima.

	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Volume (mL)	U total	Rendimento (%)
Extrato bruto	8,1	7,04	510	4131,0	100
Extrato bruto concentrado	38,8	6,93	43	1668,4	40,39

2.1.1. Imobilização por encapsulação em filmes de polióxido de etileno (PEO)

Após imobilização da enzima em PEO a atividade hidrolítica não pôde ser determinada, pois em meio aquoso ocorre solubilização do filme. Assim, a imobilização foi avaliada diretamente pela atividade de transesterificação do *p*NPP (item 1.3.1). O resultado está apresentado na Tabela II.2. O aumento da atividade de transesterificação da lipase imobilizada em PEO pode ser pelo fato dos substratos se difundirem pela membrana e se aproximarem com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador.

Tabela II.2: Relação entre lipase liofilizada e lipase imobilizada em PEO

	U/g (adicionadas ao sistema)	UT/g	UT/U
Enzima livre liofilizada	100	0,52	0,0052
Enzima imobilizada em PEO	28,15	1,81	0,0643

U: unidade de hidrólise; UT: unidade de transesterificação.

A reutilização da enzima imobilizada em PEO aplicada em sistema de transesterificação foi estudada por até 5 ciclos. O suporte foi lavado com *n*-hexano após cada ciclo. Os resultados estão apresentados na Figura II.2.

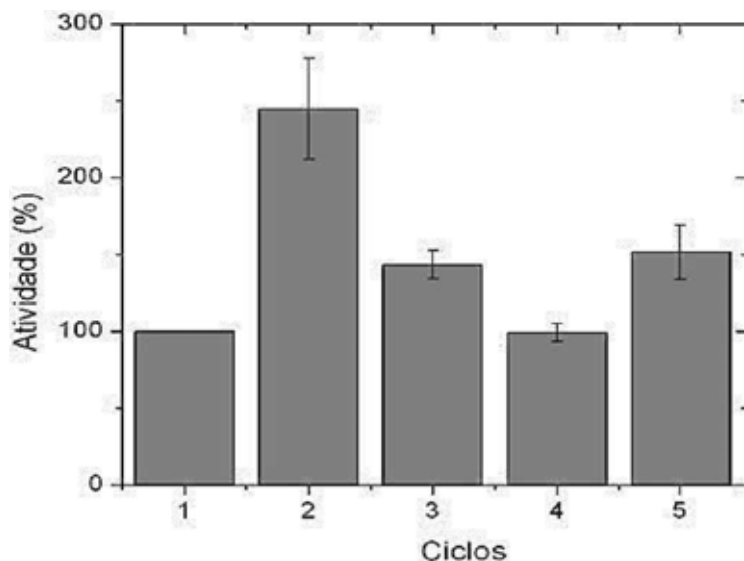


Figura II.2: Reutilização da lipase de *Fusarium oxysporum* imobilizada em PEO em reação de transesterificação. Condições de ensaio: 37 °C, 200 rpm, 15 min, 300 mg de filme.

Queiroz e Nascimento (2002) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas* sp. em PEO e utilizaram na resolução do *R,S*-mandelato de metila com acetato de vinila como agente acilante, em vários solventes orgânicos. O método foi bastante efetivo obtendo-se conversão de aproximadamente 50%. Vecchia, Nascimento e Soldi (2004), utilizando lipase de *Rhizopus oryzae* na presença de 2% de PEO, obtiveram 85% de conversão na esterificação do ácido láurico com pentanol em hexano. Estes resultados estão de acordo com os encontrados neste trabalho e indicam que interações de caráter mais hidrofóbico tipo “enzima–polímero” devem predominar neste sistema.

2.1.1.1. Efeito da concentração proteica

A Figura II.3 apresenta o comportamento do sistema enzimático em relação à quantidade de proteína imobilizada. Como demonstrado, quando adicionado 1 mg de proteína por filme não houve atividade significativa. Contudo, com o aumento progressivo desse fator observou-se aumento da atividade de transesterificação, até atingir seu ponto máximo em 45 mg de proteína por grama de filme.

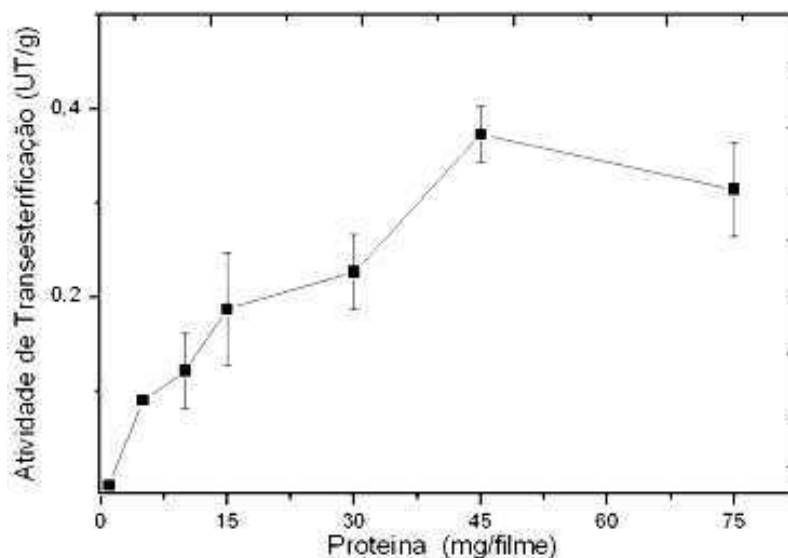


Figura II.3: Influência da concentração de proteína imobilizada em PEO na atividade de transesterificação da lipase de *Fusarium oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, 200 rpm, 15 min, 300 mg de filme.

2.1.1.2. Efeito na atividade enzimática da temperatura de secagem do filme de PEO

Os experimentos foram realizados de 30 a 80 °C. Em relação à maior temperatura testada, a justificativa é baseada na intenção de testar a estabilidade do sistema imobilizado em altas temperaturas.

Os resultados apresentados mostram que mesmo em altas temperaturas de secagem do filme, quando imobilizada em PEO, a lipase manteve-se ativa para transesterificação do pNPP a palmitato de metila (Figura II.4). A 80 °C percebe-se queda de 59% na eficiência. Contudo, vale ressaltar que as temperaturas de 60 e 70 °C mostram-se extremamente eficientes, visto que as atividades observadas nestes pontos são tão boas quanto no ponto padrão (30 °C). Além disso, ocorre a otimização do processo, já que em temperaturas mais altas o filme seca em um espaço de tempo menor mantendo as mesmas qualidades.

De acordo com Oliveira (2009) e Tassi (2010), a lipase produzida pelo fungo filamentoso utilizado neste trabalho possui melhor estabilidade a 37 °C quando utilizada em sua forma bruta e livre, sendo que a 30 °C há apenas cerca de 9% de perda da mesma e a partir de 40 °C esta porcentagem aumenta chegando a 99% de inatividade a 50 °C. Estes dados, portanto, sugerem que o polímero exerceu efeito protetor na conformação da enzima, impedindo a desnaturação em temperaturas acima de 50 °C.

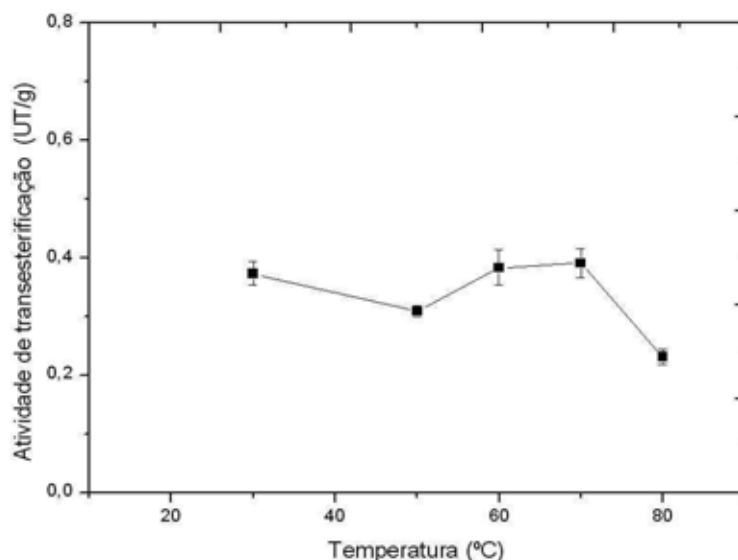


Figura II.4: Influência da temperatura de secagem dos filmes de PEO/enzima na atividade de transesterificação da lipase de *Fusarium oxysporum*. Condições de imobilização: 45mg de proteína. Condições de ensaio: 200 rpm, 15 min, 300 mg de enzima/suporte.

2.1.2. Imobilização por encapsulamento em alginato de cálcio

Para a imobilização da lipase de *F. oxysporum* em esferas de alginato utilizou-se extrato bruto concentrado contendo 30,5 U/mL de atividade enzimática e 7,3 mg/mL de proteína. A 5 mL de extrato bruto adicionou-se 5 mL de solução de alginato (2,5 ou 5%, m/v) e em seguida, a mistura foi gotejada sobre solução de CaCl_2 (0,02 mol/L). Obteve-se esferas de tamanho uniforme (0,4 mm de diâmetro) e massa total de 2,8 g com atividade de 1,38 e 1,07 U/g para imobilização com 2,5 e 5% de alginato, respectivamente. A solução de CaCl_2 e o tampão de lavagem das esferas foram analisados, mas não foi detectada atividade enzimática. Para a análise da enzima imobilizada adicionou-se 0,3 g de esferas de alginato ao sistema padrão para hidrólise do pNPP em meio aquoso (Tabela II.3).

Não foi detectada enzima residual nas soluções de lavagem, porém apenas 3,53 e 2,11% de atividade foram detectadas em imobilização com 2,5 e 5% de alginato, respectivamente. Estes valores indicam um encapsulamento total da enzima, porém também impedimento do contato enzima/substrato resultando em baixa atividade. Conforme os ensaios de reciclo foram sendo realizados, as esferas foram se desfazendo e a enzima foi gradativamente sendo liberada e aumentando a atividade na solução. A enzima foi liberada mais facilmente com a menor concentração de alginato nas esferas (2,5%). Quando os valores de retenção se

aproximam de 25% as esferas perdem a rigidez não tornando possível a sua recuperação. O sistema foi reutilizado por até 4 ciclos. Não foram obtidos resultados para transesterificação com a lipase imobilizada em alginato.

Tabela II.3: Reutilização da lipase de *Fusarium oxysporum* imobilizada em Alginato de Cálcio em reação de hidrólise .

Ciclos	Alginato de Cálcio			
	2,5%		5%	
	U/g	%	U/g	%
1°	1,38	100	1,07	100
2°	3,12	226,08	2,49	232,71
3°	9,57	693,49	3,05	285,05
4°	10,13	734,06	5,26	491,59

A atividade hidrolítica das esferas de alginato/enzima foi aumentando conforme sua reutilização devido ao desgaste do suporte e liberação da enzima para o meio, sendo observado aumento menos expressivo quando utilizadas esferas mais concentradas com alginato de cálcio e consequentemente mais rígidas.

Yadav e Jadhav (2005) obtiveram 21 e 26% de imobilização em alginato de cálcio utilizando lipase de *Pseudomonas cepacia* e *Candida antarctica*, respectivamente, uma porcentagem considerada baixa. Sawangpanya Muangchim e Phisalaphonng (2010), utilizando lipase de *Candida rugosa*, obtiveram 74% de conversão de óleo de palma em ésteres etílicos com a enzima imobilizada em alginato de cálcio.

2.1.3. Imobilização por adsorção em Celite® 545

A enzima foi produzida por fermentação submersa e concentrada em sacarose durante 7 h. Após processo de imobilização, tanto suporte quanto solventes (imobilização e lavagem) foram analisados quanto à atividade de acordo com método padrão frente ao palmitato de *p*-nitrofenila (pNPP). Os solventes de lavagem não apresentaram atividade enzimática residual, indicando não haver perda de enzima não imobilizada.

A Celite® 545 apresentou partículas médias de 0,002 mm² (0,05 mm de diâmetro e 0,01 mm de espessura) com alto grau de porosidade (Figura II.5 A e B).

É possível observar o suporte com a enzima nas figuras II.6 C e D apresentando as porosidades preenchidas.

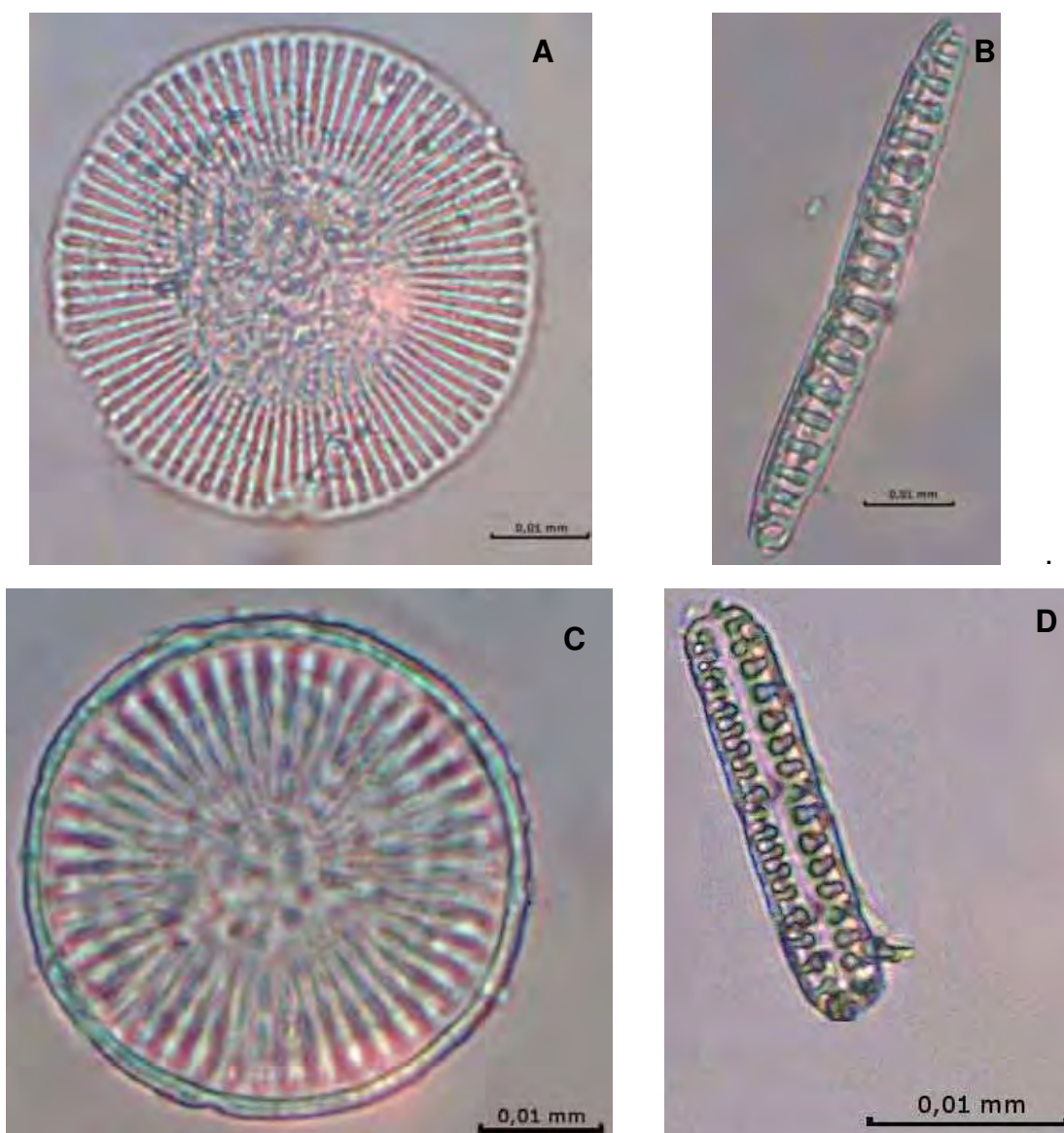


Figura II.5: Micrografia ótica de Celite[®] 545 em aumento de 1000x. A) Vista superior dos grânulos antes da imobilização. B) Vista lateral dos grânulos antes da imobilização. C) Vista superior dos grânulos após a imobilização. D) Vista lateral dos grânulos após imobilização.

Foram observadas atividades de 36,0 U/g e 0,32 UT/g para hidrólise e transesterificação, respectivamente, com rendimento de 120 e 100%, respectivamente. A atividade da enzima imobilizada, em reação de hidrólise e transesterificação, está apresentada na Tabela II.4. A enzima imobilizada foi reutilizada por até 4 ciclos de hidrólise e transesterificação. Para avaliar os níveis de dessorção da lipase em Celite, o suporte foi lavado entre os ciclos de hidrólise com

tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0, sendo este tampão avaliado em relação a capacidade de hidrólise. Observou-se a ocorrência de desorção de 7% da enzima após o primeiro ciclo e entre 4 e 2,5% nos ciclos seguintes.

Tabela II.4: Atividade da lipase de *Fusarium oxysporum* imobilizada em Celite em hidrólise e transesterificação do pNPP.

Ciclo	Hidrólise		Transesterificação	
	U/g	Rendimento (%)	UT	Rendimento (%)
1°	36,0 ± 3,5	120,0	0,320 ± 0,12	100,0
2°	28,8 ± 5,0	96,0	0,543 ± 0,14	169,7
3°	22,9 ± 1,2	76,4	0,728 ± 0,14	227,5
4°	5,0 ± 0,6	16,6	0,869 ± 0,19	271,6

Em casos de imobilização em Celite, os rendimentos em reciclos de hidrólise citados na literatura são baixos, com perda de até 70% logo no primeiro ciclo, devido à fraca interação hidrofóbica existente entre enzima/suporte na adsorção ou à forte interação água/enzima (KHARE e NAKAJIMA, 2000; CHANG et al., 2007). Esse efeito pode ser atribuído à presença de tensoativos (goma arábica, Triton X-100, entre outros) normalmente usados no preparo dos substratos emulsificados, os quais geralmente facilitam a remoção da enzima fixada ao suporte (efeito de lixiviação). Entretanto, com a lipase produzida neste estudo pela cepa de *F. oxysporum*, foi possível a utilização por até 3 ciclos de hidrólise com perda de no máximo 25% de atividade em relação à enzima livre (Tabela II.4). Esse resultado pode ser devido à hidrofobicidade bastante elevada da enzima, permitindo maior interação entre enzima/suporte e, assim, resultados superiores aos descritos na literatura.

Os rendimentos em reação de transesterificação apresentaram elevação no decorrer dos reciclos atingindo 271,5% no quarto ciclo. Este fato pode ser atribuído a uma conformação catalítica favorável à transesterificação induzida pela imobilização. Khare e Nakajima (2000) notaram que a lipase de *Rhizopus japonicus*, que não apresenta capacidade de transesterificação em sua forma livre, passou a apresentar considerável atividade de síntese quando imobilizada em Celite. Triantafyllou, Adlercreutz e Mattiasson (1993) e Mustranta, Forssell e Poutanen (1993) relataram aumento de 110 e 120% na atividade de transesterificação após a imobilização da lipase de *C. rugosa* e *Candida cylindracea* em Celite, respectivamente.

2.1.3.1. Efeito do tempo de contato enzima/suporte

Para a imobilização da enzima em Celite, o suporte e a enzima permaneceram em contato, em isopropanol, variando o tempo de incubação entre 2 e 90 min (Tabela II.5).

Tabela II.5: Influência do tempo durante o procedimento de adsorção da lipase de *Fusarium oxysporum* em Celite.

Tempo (min)	Atividade (U/g-suporte)	Atividade específica (U/mg-proteína)	Rendimento (%)	Desorção (%)
2	38,00 ± 1,10	4,75	126,66	8,12
10	39,25 ± 0,95	4,73	130,83	9,25
30	24,31 ± 0,98	3,04	81,03	6,46
40	28,77 ± 1,02	2,21	95,90	9,28
50	34,10 ± 1,80	3,69	113,66	5,20
60	27,05 ± 1,30	2,70	90,16	9,69
90	36,30 ± 1,25	4,52	121,66	6,47

Não foi verificada diferença significativa entre os diferentes tempos de contato enzima/suporte analisados, sendo que 2 min de contato foram suficientes para adsorção completa. O tempo de contato também não interferiu na força de ligação enzima/suporte, já que o nível de desorção permaneceu semelhante. Outros autores verificaram tempos muito maiores para imobilização de enzimas em Celite. Khare e Nakajima (2000) necessitaram de 60 min para imobilização da lipase de *Rhizopus japonicus* e Knezevic, Mojovic e Adnadjevic (1998), Zeng, Luo e Gong (2006) e Chang e col. (2007) necessitaram de 90 min para obtenção do melhor rendimento na imobilização das lipase de *C. cylindracea*, pâncreas suíno e *C. rugosa*, respectivamente. A rapidez na imobilização da lipase de *F. oxysporum* novamente sugere que a enzima tenha um forte caráter hidrofóbico.

2.1.3.2. Influência da temperatura de incubação

Para a imobilização da enzima em Celite, o suporte e a enzima permaneceram em contato, em isopropanol, por 2 min, variando a temperatura entre 4 a 40 °C (Tabela II.6).

Tabela II.6: Influência da temperatura durante o procedimento de adsorção da lipase de *Fusarium oxysporum* em Celite.

Temperatura (°C)	Atividade (U/g-suporte)	Rendimento (%)	Desorção (%)
4	20,70 ± 1,15	69,00	11,2
10	17,35 ± 1,00	57,83	21,9
20	11,65 ± 2,10	38,83	55,4
30	14,00 ± 1,30	46,66	26,8
40	14,36 ± 1,00	47,86	23,9

Atividade enzimática mensurada à 37 °C.

Como observado na tabela II.6, a temperatura de incubação afetou o rendimento da imobilização, observando-se melhores resultados a 4 °C. Com o aumento da temperatura foi observado o decréscimo do rendimento juntamente com o aumento dos níveis de desorção após lavagem com tampão. Estes resultados podem ser explicados pela diminuição da taxa de desnaturação da enzima pelo solvente de adsorção em baixa temperatura, visto que em temperaturas mais elevadas os solventes podem levar à desnaturação por rompimento das ligações de hidrogênio e estabelecimento de interações apolares, importantes na manutenção da conformação proteica e da adsorção enzima/suporte (CHANG et al., 2006).

2.1.3.3. Influência da concentração de proteínas

Para a imobilização da enzima em Celite, o suporte e a enzima permaneceram em contato, em isopropanol, por 2 min a 4 °C, variando a concentração de proteína entre 1 e 10 mg (Tabela II.7).

Tabela II.7: Influência da concentração de proteína durante o procedimento de adsorção da lipase de *Fusarium oxysporum*.

Concentração de proteína (mg/g-suporte)	Atividade (U/g-suporte)	Rendimento (%)	Atividade específica (U/mg-proteína)	Desorção (%)
1	87,95 ± 1,3	488,00	87,95	8,05
2	116,07 ± 3,1	322,40	58,03	4,23
4	129,63 ± 5,7	180,05	32,40	5,91
6	144,86 ± 4,3	150,90	24,14	5,46
8	188,37 ± 7,8	100,60	23,55	3,71
10	145,39 ± 5,2	80,77	14,54	7,53

Aumentando-se a concentração de proteína em contato com o suporte verificou-se aumento da atividade por massa de suporte, porém com redução da atividade específica e rendimento. A quantidade de lipase imobilizada foi limitada, com decréscimo do rendimento, provavelmente por causa da saturação dos poros do suporte (JIAN et al., 2005). Com base nesses resultados, percebemos que a atividade específica da enzima deve diminuir quando a relação enzima/suporte aumenta. A maior atividade específica e também maior rendimento, 87,95 U/mg e 488,0%, respectivamente, foram verificados com a relação suporte/enzima de 1 mg/g. Todavia, a relação enzima/suporte de 6 mg/g leva a uma maior atividade por massa de suporte com 144,86 U/g e rendimento de 150,9%.

Para evitar maior custo de enzima necessária para novas aplicações industriais e manter alta atividade por massa de suporte aliada a um alto rendimento, foi definido que a proporção enzima/suporte de 6 mg/g era a mais indicada para a imobilização da lipase de *F. oxysporum* em Celite.

2.1.4. Imobilização por adsorção em Octil Sepharose CL-4B

Os testes de imobilização da lipase de *F. oxysporum* em Octil Sepharose CL-4B foram realizados adicionando-se 2 mL (70 U e 11 mg de proteína) de extrato bruto por grama de resina. Para isso, enzima e suporte foram mantidos em agitação por 60 min e depois separados por centrifugação a 11000 g por 10 min. Com a enzima imobilizada em Octil-Sepharose foram observadas atividades de 97,33 U/g e 0,066 UT/g para hidrólise e transesterificação, respectivamente, com rendimento de 572,5% para hidrólise. Apesar do alto rendimento, sua taxa de desorção foi quase completa no primeiro ciclo (94,27%), não permitindo sua reutilização.

2.1.4.1. Influência do tempo de contato enzima/suporte

Não foi verificada diferença significativa entre os diferentes tempos de contato enzima/suporte analisados, sendo que 10 min de contato foram suficientes para adsorção completa ao suporte.

2.1.4.2. Influência da concentração de proteínas

Aumentando-se a concentração de proteína em contato com o suporte verificou-se aumento da atividade por massa de suporte, porém com redução da

atividade específica e rendimento. Com base nesses resultados, conclui-se que a atividade específica da enzima deve diminuir quando a relação enzima/suporte aumenta. O maior rendimento, 572,5%, foi verificado com a relação suporte/enzima de 6mg/g, porém a taxa de desorção permaneceu elevada em todos os ensaios não caracterizando, então, uma real imobilização.

2.1.5. Considerações gerais

Os dados permitem concluir que Celite[®] 545 e PEO podem ser utilizados como suportes para a imobilização da lipase de *F. oxysporum*. Apesar de não ser possível a sua utilização em meio aquoso, a matriz polimérica de PEO se mostra bastante interessante quando se trata de reações de síntese em meio orgânico, com altos rendimentos e possibilidade de reutilização sem perda de atividade. A imobilização em Celite conferiu alto rendimento e capacidade de reutilização à enzima, além de ser material de baixo custo e necessitar de técnica simples e rápida para a imobilização, sendo então este suporte escolhido para sequencia dos estudos de caracterização bioquímica parcial da lipase livre e imobilizada de *F. oxysporum* (Cap. III).

CAPÍTULO III - COMPARAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS ENTRE LIPASE DE *Fusarium oxysporum* LIVRE E IMOBILIZADA EM CELITE.

1. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LABI) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus Assis, com parte dos experimentos sendo realizados no Biorefining Research Institute (BRI) da Lakehead University – Thunder Bay/ON Canadá em colaboração com o Dr. Robert Frans Huibert Dekker.

1.1. Micro-organismo

A cepa de *Fusarium oxysporum* FCLA MA41 foi mantida em meio MEA (extrato de malte ágar) com incubação por um período de 5-7 dias à temperatura de 28 °C em placas de Petri.

1.2. Esterilização dos meios e equipamentos

Para garantir condições estéreis de crescimento dos micro-organismos, os meios sólidos de propagação, do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

1.3. Produção da enzima em fermentação submersa

O meio de fermentação foi composto de óleo de milho 1,79% (m/v), tensoativo Triton X-100 1,79% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v), utilizando Erlenmeyers de 1000 mL contendo 200 mL de meio de cultura. O inóculo foi iniciado pela transferência de 3 discos de ágar e micélio de 0,25 cm² e o cultivo mantido por 72 h a 28 °C e 180 rpm. Após a fermentação o cultivo foi interrompido e o sobrenadante de fermentação filtrado para separação de células.

1.4. Imobilização da enzima

De acordo com os estudos de imobilização da lipase de *F. oxysporum* realizados no Capítulo II, a enzima foi imobilizada em Celite® 545 seguindo as melhores condições estudadas:

Para preparação da enzima imobilizada em Celite foi utilizada a metodologia descrita por Chang et al. (2006) com modificações. O extrato bruto foi misturado a 1 g de Celite na concentração de 6 mg de proteína por grama de suporte. Em seguida foi adicionado isopropanol a 4 °C (10 mL) e a mistura homogeneizada por 2 min. A lipase imobilizada foi coletada por filtração e lavada duas vezes com n-hexano para remover a enzima não adsorvida.

1.5. Caracterização bioquímica da enzima livre e imobilizada

1.5.1. Influência do pH na atividade e estabilidade

A influência do pH na atividade lipolítica foi mensurado tanto para a enzima livre quanto imobilizada. Os testes foram realizados variando-se o pH do meio reacional de extremos ácidos (2,6 e 3,0) e extremos básicos (8,0, 9,0 e 10,0). O método precisou ser adaptado, conforme descrito a seguir, porque o *p*-nitrofenol (pNP) não possui coloração abaixo de pH 6,0.

Para a enzima livre, a reação foi realizada em tubos de ensaio com 4,8 mL de meio reacional pré-equilibrado com tampão no pH desejado a 37 °C. Após a adição de 0,2 mL de solução enzimática, alíquotas de 0,1 mL foram removidas, adicionadas a 0,9 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 em banho de gelo, interrompendo a reação. A reação foi acompanhada por 5 min e as atividades foram calculadas usando o coeficiente de extinção molar do *p*NPP determinado a pH 8,0.

Para a enzima imobilizada, foram utilizados 5 mL de meio reacional equilibrado no pH desejado e adicionado 0,01g de suporte/enzima, alíquotas de 0,1 mL foram retiradas e adicionadas a 0,9 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 à 4 °C, a fim de interromper a reação.

A estabilidade ao pH foi determinada pela incubação da enzima livre ou imobilizada em tampões com valores de pH extremos ácidos e básicos por 1 h a 37 °C. Após a incubação, a atividade residual foi determinada usando tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0, pelo método padrão.

1.5.2. Influência da temperatura na atividade e estabilidade

Para a determinação da influência da temperatura sobre a atividade lipolítica da enzima imobilizada e livre foi realizada a hidrólise do pNPP em temperaturas entre 30 e 80 °C, em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0. A enzima foi incubada em meio reacional pré-equilibrado na temperatura a ser estudada e a atividade mensurada por método padrão.

A estabilidade à temperatura foi determinada através da incubação da enzima livre e imobilizada em temperaturas entre 37 e 80 °C, em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8, na ausência do substrato. A atividade lipolítica residual foi determinada a 37 °C pelo método padrão.

1.5.3. Estabilidade em solventes orgânicos

Para determinar a estabilidade da enzima imobilizada em solventes polares (metanol, isopropanol, etanol e acetona), 0,05 g de suporte/enzima foi incubado (1 h, 37 °C) em diferentes concentrações de solventes (25, 50, 80 e 100 %, v/v). Para a estabilidade em solventes apolares, 0,05 g de suporte/enzima foi incubado diretamente em butanol, tolueno, hexano, isooctano e heptano. Após a incubação, o suporte foi separado por filtração e submetido à atividade enzimática utilizando o procedimento padrão.

Para determinar a estabilidade da enzima livre em metanol, isopropanol, etanol e acetona o sobrenadante de cultivo foi incubado (1 h, 37 °C) em diferentes concentrações de solventes (25, 50, 80 e 100%, v/v). No caso dos solventes butanol, tolueno, hexano, isooctano e heptano, o sobrenadante de cultivo foi adsorvido em papel de filtro Whatman n.4 de 1 cm² e incubado na presença dos solventes (1 h, 37 °C). Em seguida, o papel de filtro foi transferido para tubos com 5 mL de tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0 para eluição da enzima. Considerando como 100% de atividade a enzima adsorvida em papel, sem pré-incubação em solvente e desorvida em tampão. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o procedimento padrão.

1.6. Métodos analíticos

1.6.1. Atividade lipolítica pela hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila

A atividade lipolítica das amostras foi mensurada a partir da hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP), método espectrofotométrico inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979) e modificado por Lima (2004). O método baseia-se na hidrólise do *p*NPP pela enzima em meio aquoso contendo como surfactante Triton X-100. A liberação do *p*-nitrofenol (*p*NP), de coloração amarela, é seguida de leitura em espectrofotômetro a 410 nm (Figura III.1). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 $\mu\text{mol/min.}$ de *p*NP. O coeficiente de extinção molar do *p*NP ($1,50 \times 10^4 \text{ mol.L/cm.min.}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura.

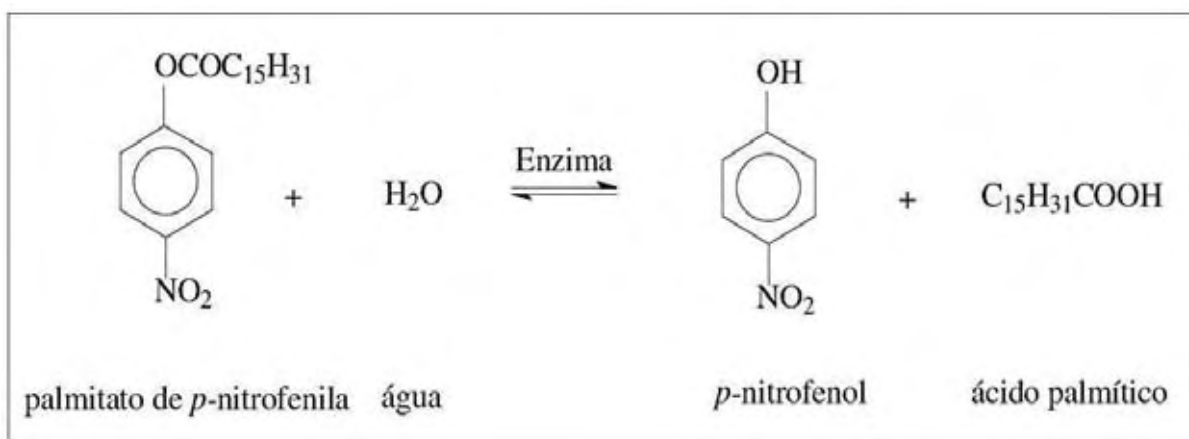


Figura III.1: Reação de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila por lipases, com liberação de *p*-nitrofenol e ácido palmítico.

1.6.2. Determinação de proteínas

A dosagem de proteínas durante os cultivos e ensaios de imobilização foi feita de acordo com o método de Bradford (1976), calculando a concentração de proteínas a partir da curva de calibração com o padrão soro-albumina bovina.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Mensuração da atividade enzimática

Após fermentação submersa, o extrato bruto da cultura foi concentrado com sacarose e posteriormente utilizado para a imobilização. A atividade lipolítica encontrada em cada etapa é apresentada na tabela III.1.

Tabela III.1: Atividade lipolítica e atividade específica das enzimas livre e imobilizada.

	AT* (U/mL)	AT* (U/g)	AT.E* (U/mg)
Enzima livre	$2,10 \pm 0,15$	----	$2,71 \pm 0,20$
Enzima livre concentrada	$17,92 \pm 0,15$	----	$8,15 \pm 0,07$
Enzima imobilizada	----	$98,17 \pm 9,60$	$44,62 \pm 4,36$

*AT = Atividade lipolítica; AT. E = Atividade específica. Condição de ensaio: 37 °C, pH 8,0, 1 min.

Paralelo ao resultado de atividade de hidrólise foi analisado a capacidade de reutilização da enzima imobilizada (Figura III.2). O primeiro ciclo foi considerado 100% (135 U/g); após esse ciclo a enzima foi resgatada e lavada com n-hexano, a fim de remover qualquer reação em andamento, assim sucessivamente até o 5º ciclo. Notou-se uma diminuição progressiva da atividade nos 5 ciclos analisados. Entretanto, esse resultado não impossibilita a reutilização da lipase imobilizada até pelo menos o terceiro ciclo de hidrólise.

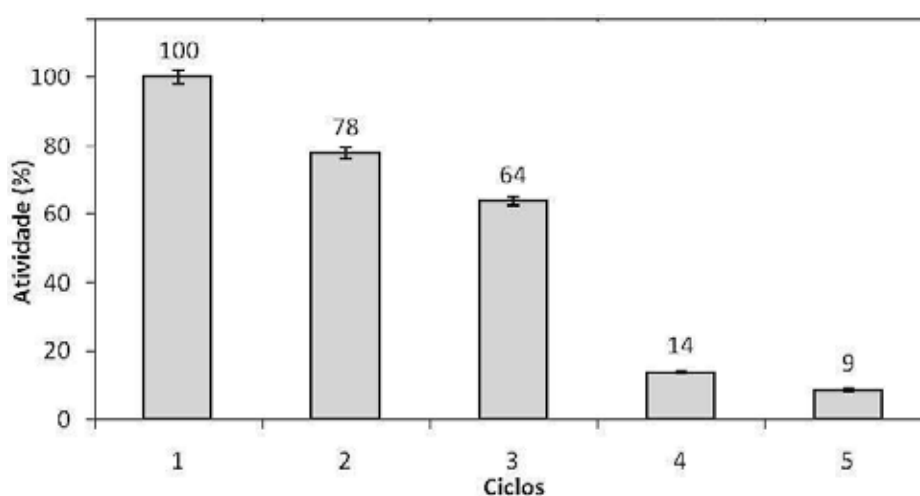


Figura III.2: Capacidade de reutilização da lipase de *F. oxysporum* após imobilização. Condições de ensaio: 37 °C, pH 8,0. Atividade de 100% equivalente ao primeiro ciclo de atividade, 135 U/g.

2.2. Atividade e estabilidade frente a extremos de pH

Tanto lipase livre quanto imobilizada não apresentaram atividade significativa em pH ácidos. Para a enzima livre o máximo de atividade ocorreu em pH 8,0, com uma redução de 25 e 23% da atividade relativa em pH 9,0 e 10,0, respectivamente, resultado que não descarta possíveis utilizações nessas escalas de pH. Todavia, com a enzima imobilizada essa queda em pH 9,0 não ocorreu, evidenciando uma manutenção da atividade em meio alcalino quando a lipase está imobilizada em Celite®545 (Figura III.3).

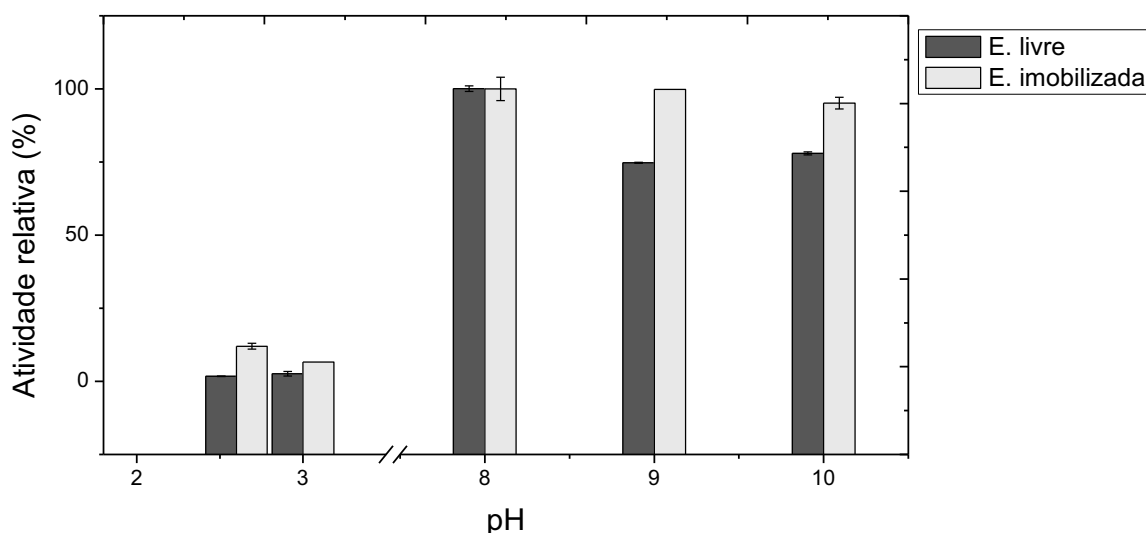


Figura III.3: Efeito de extremos de pH na atividade lipolítica da lipase livre e imobilizada de *F. oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, leitura com tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata. Para enzima livre o ponto de 100% equivale a 2,62 U/mL de extrato bruto concentrado, enquanto para enzima imobilizada equivale a 60 U/g de suporte. A reação foi acompanhada no tempo de 2 minutos.

Paula et al. (2008) verificaram pH ótimo de 7,5 tanto para enzima de *Candida rugosa* livre quanto para a imobilizada por adsorção física em POS-PVA. Fadiloglu e Soylemez (1998) observaram uma redução do pH ótimo de 7,0 para 6,5 após a imobilização da lipase de *C. rugosa* em Celite® 545, ao contrário de Perez et al. (2007) que verificaram um aumento do pH ótimo de 7,0 para 8,5 após a imobilização da mesma lipase em celulignina ativada com metaperiodato de sódio.

Com relação a estabilidade ao pH verificou-se que a enzima imobilizada apresentou atividade residual maior quando comparada à enzima livre, sendo esse efeito mais marcante nos ensaios com pH 9 e 10 (Figura III.4).

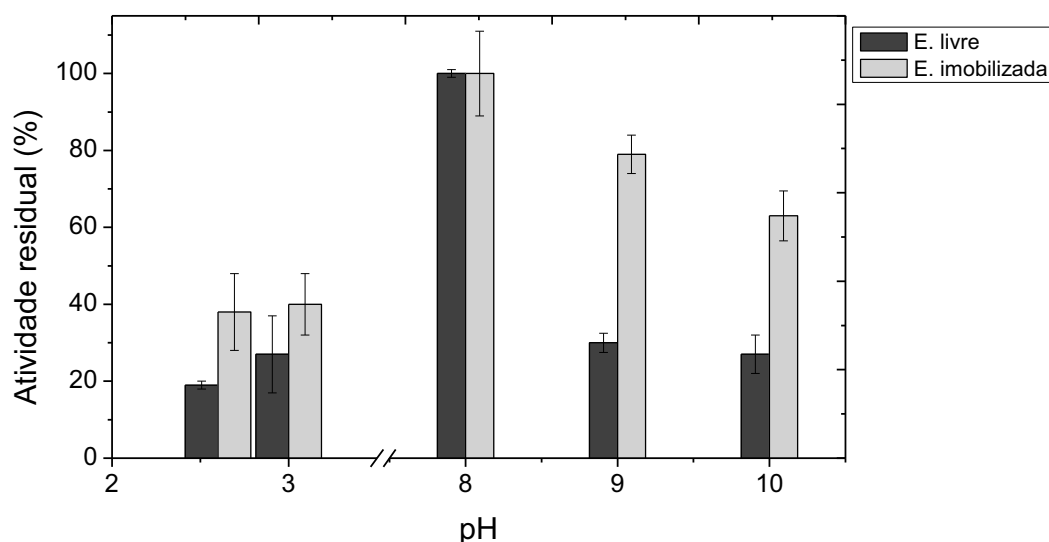


Figura III.4. Efeito de extremos de pH na estabilidade da lipase livre e imobilizada de *Fusarium oxysporum*. Condições de ensaio: 37 °C, incubada durante 1 h em variados tampões. Os ensaios foram realizados em triplicata. Para enzima livre e imobilizada sem pré-incubação em pH 8,0 foi considerado 100%, sendo equivalente a 17,9 U/mL de extrato e 98,17 U/g de suporte, respectivamente.

2.3. Atividade e estabilidade frente a diferentes temperaturas

A influência da temperatura na atividade enzimática foi investigada através do método padrão, numa faixa de temperatura de 30 a 80 °C.

Enzima livre e imobilizada apresentaram máximo de atividade em 37 °C (Figura III.5). À medida que a temperatura aumentou, a atividade da enzima livre diminuiu consideravelmente. Todavia, a enzima imobilizada apresentou-se ativa em temperaturas entre 40 e 70°C; evidenciando que a imobilização por adsorção realmente conferiu proteção à enzima. A estabilidade à temperaturas elevadas é uma das características requeridas de enzimas com potencial para aplicação industrial, como as lipases, uma vez que possam ser submetidas às condições típicas no setor, como reatores com temperaturas superiores à 70 °C (HASAN, SHAH E HAMEED, 2006), além de utilização de substratos com ao alto ponto de fusão (KLIBANOV, 2001).

A enzima imobilizada por adsorção pode perder a sua flexibilidade conformacional, mas mantém sua estrutura nativa. Esta perda de flexibilidade da enzima pode ter um efeito benéfico sobre a atividade, sendo atribuído a este fator o aumento da estabilidade à temperatura em ambientes aquo-restritos.

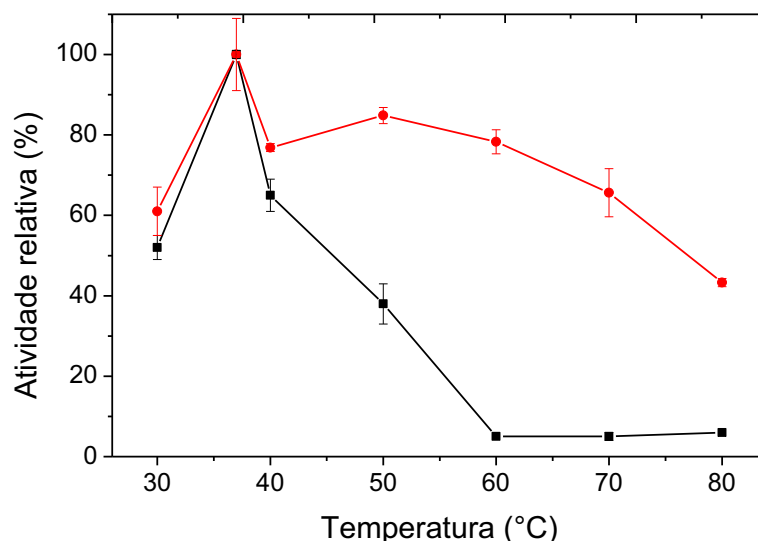


Figura III.5: Efeito da temperatura na atividade da lipase livre (■) e imobilizada (●) produzida por *F. oxysporum*. Condição de ensaio: temperatura entre 30 e 80 °C, pH 8,0. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 37 °C (100%). Equivalente a 17,92 U/mL e 98,17U/g para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

A estabilidade à temperatura foi realizada incubando-se a enzima livre e imobilizada, por 1 h, em tampão fosfato 0,05 mol/L pH 8, entre 37 e 80 °C (Figura III.6).

A enzima livre não foi estável em altas temperaturas, visto que atingiu valores praticamente nulos de atividade residual entre 50 e 80 °C. Quanto a enzima imobilizada, não se pode dizer que ela foi termoestável, pois houve redução da atividade residual; todavia, confirma-se que a enzima imobilizada foi mais estável em altas temperaturas do que a enzima livre (Figura III.6).

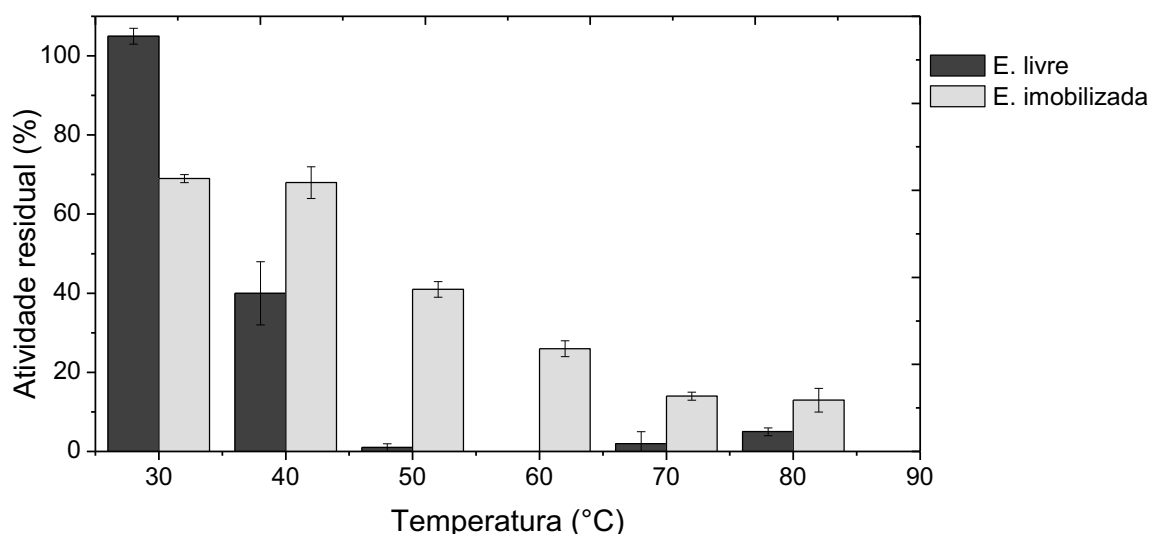


Figura III.6: Efeito da temperatura na estabilidade da lipase livre e imobilizada produzida por *F. oxysporum*. Condição de ensaio: temperatura entre 37 e 80 °C, pH 8,0 por 1 h. Ensaios realizados em triplicata. Todas as atividades foram calculadas em relação à atividade medida na temperatura padrão de 37 °C sem pré-incubação (100%). Equivalente a 17,92 U/mL e 98,17U/g para a enzima livre e imobilizada, respectivamente.

2.4. Estabilidade a solventes orgânicos polares e apolares

É uma característica das lipases a estabilidade em solventes apolares. Os resultados evidenciaram uma ativação da enzima livre em ambientes aquo-restritos, principalmente em hexano (Tabela III.2). Rúa et al. (1993) sugeriram que solventes apolares podem manter a enzima em sua conformação aberta, ou seja, em presença destes solventes, a “lid” não estaria cobrindo o sítio ativo, o que poderia justificar a ativação da enzima. Outro argumento é que os solventes apolares, ao contrário dos solventes com *Log P* menor do que 2, não retiram a água de solvatação da estrutura proteica prevenindo a desnaturação. E ainda, moléculas do solvente podem interagir com a estrutura proteica e exercer efeitos ativadores ou estabilizadores (LIMA, 2004).

Estabilidade da enzima livre foi observada em quase todos os solventes apolares, com exceção do butanol, que é o menos apolar entre os solventes analisados. A hidrofobicidade é medida através do *Log P*, sendo que quanto maior o *Log P* mais hidrofóbico é o solvente. Como o butanol apresenta fator de hidrofobicidade de 0,8 ele tem a função de remover água do sistema enzimático, o

que pode desnaturar a enzima. A enzima imobilizada apresentou-se ativa em todos os solventes apolares, até mesmo o butanol, comprovando que a imobilização conferiu proteção ao sistema enzimático. Além da estabilidade, a atividade enzimática da lipase imobilizada duplicou em relação ao controle (Tabela III.2).

A estabilidade em solventes orgânicos polares é uma importante característica, entretanto não é comum que lipases sejam estáveis nesses meios aquo-restritos, podendo determinar o uso da enzima como um catalisador em reações de síntese para a produção de ésteres alquílicos, por exemplo, além de prever quais solventes podem ser utilizados nos meios de reação. Sistemas de solventes orgânicos também oferecem outras vantagens, tanto em reações hidrolíticas quanto sintéticas, como alta solubilidade de substratos e produtos, modificação da especificidade (MIROLIAEI E NEMAT-GORGANI, 2002) e termoestabilização da enzima (CHO, YOO E KIM, 2000).

A enzima livre apresentou atividades residuais inferiores ao controle (Tabela III.2), quando submetida a metanol e isopropanol, entretanto esses resultados não impossibilitam o uso da lipase livre na síntese de biocombustível. Porém, a redução da atividade enzimática em 100% de metanol, etanol e acetona foi de apenas 37, 47 e 36%, respectivamente, demonstrando característica incomum à lipase produzida por *F. oxysporum* FCLC MA41. As atividades reduzidas quando lipases são submetidas a altas concentrações de solventes polares pode ser explicada pela excessiva retirada de água de solvatação da estrutura proteica além da ativação interfacial, o que os torna incompatíveis com a atividade enzimática (ZACKS E KLIVANOV, 1998 e SZTAJER et al., 1992).

Em baixas concentrações (25%) de acetona e etanol houve uma ativação enzimática, podendo ser explicado pelo fato de que é uma característica das lipases formarem agregados, e a função desses solventes pode ser desfazer esses agregados e remover o material lipídico residual, fato que pode resultar em um aumento da atividade enzimática (SUGIHARA, TANI e TOMINAGA, 1991).

A enzima imobilizada apresentou atividade 451% superior ao controle quando submetida em baixas concentrações de metanol (25%); resultado de interesse, pois este solvente é um dos mais utilizados na síntese de biocombustível e que são utilizados em uma concentração não superior a 20%. Em altas concentrações de isopropanol e acetona (100%) a enzima imobilizada sofreu

ativação e foi estável em altas concentrações de etanol; evidenciando que a imobilização em Celite[®] 545 por adsorção conferiu proteção ao sistema enzimático contra a desnaturação.

Tabela III.2: Atividade residual em solventes orgânicos polares e apolares

Solvente orgânico	Log P	Atividade residual (%)	
		Livre	Imobilizada
Tampão fosfato pH8		100	100
Metanol 25%	-0,73	69 ± 12	451 ± 49
50%		38 ± 5	137 ± 25
80%		45 ± 7	83 ± 19
100%		63 ± 21	80 ± 12
Etanol 25%	-0,24	164 ± 17	71 ± 16
50%		84 ± 6	91 ± 16
80%		86 ± 3	95 ± 35
100%		53 ± 6	100 ± 5
Isopropanol 25%	-0,28	40 ± 8	82 ± 13
50%		24 ± 5	88 ± 18
80%		43 ± 4	101 ± 11
100%		35 ± 1	130 ± 10
Acetona 25%	-0,23	230 ± 21	53 ± 2
50%		14 ± 4	34 ± 2
80%		40 ± 4	168 ± 8
100%		64 ± 8	132 ± 22
Butanol	0,8	58 ± 8	174 ± 24
Tolueno	2,5	105 ± 6	208 ± 31
Hexano	3,5	145 ± 15	213 ± 8
Heptano	4	113 ± 4	185 ± 14
Isooctano	4,51	161 ± 14	141 ± 23

*Os valores de porcentagens que acompanham os solventes orgânicos polares correspondem à quantidade de solvente em tampão pH 8,0. Foram considerados 100% de atividade da enzima livre incubada em tampão (4,5 U/mL) para os solventes polares e nos apolares 100% a atividade da enzima adsorvida em papel filtro (2,12 U/mL), sem incubação em solvente, e desorvida em tampão. Ensaios em triplicata. Log P: medida de hidrofobicidade do solvente calculada pelo logaritmo do coeficiente de partição de um dado solvente em um sistema padrão octanol/água.

2.5. Considerações gerais

A partir dos dados obtidos é possível concluir que Celite[®]545 pode ser usada como suporte para a imobilização de lipase de *Fusarium oxysporum*, proporcionando além de forte ligação por adsorção, alteração das propriedades bioquímicas da enzima, sendo verificado aumento da atividade em temperaturas acima de 50 °C e

equivalência nos pH 8,0 e 9,0, bem como estabilidade nessas escalas de pH quando comparada com a enzima livre.

A enzima imobilizada apresentou ativação quando incubada em elevadas concentrações de isopropanol e acetona, bem como em baixas concentrações de metanol e manteve-se estável quando incubada em altas concentrações de etanol, o que possibilita que a enzima imobilizada seja utilizada como biocatalizador em reações de transesterificação. Quanto aos solventes apolares a enzima imobilizada apresentou ativação quando incubada em todos os solventes analisados, principalmente hexano.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Para a produção da lipase por *Fusarium oxysporum* em fermentação submersa, o meio de cultivo otimizado contendo óleo de milho 1,79% (v/v), Triton X-100 1,79% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v) apresentou a melhor atividade volumétrica (8,3 U/mL).
- Dentre as fontes de nitrogênio estudadas (extrato de levedura, ureia, nitrato de sódio, nitrato de amônio e sulfato de amônio), o extrato de levedura e o sulfato de amônio se destacaram por proporcionarem as maiores atividades enzimáticas, sendo o sulfato de amônio mais interessante por se tratar de fonte inorgânica e economicamente viável.
- Dentre as fontes de carbono estudadas (óleo de milho, dendê, crambe, oliva, linhaça, soja, glicerol e gordura de frango), com exceção de glicerol e óleo de linhaça, que apresentaram baixa atividade, não houve diferença estatística entre as atividades apresentadas para as demais fontes utilizadas.
- Ensaios utilizando delineamento fatorial e as fontes de carbono e nitrogênio selecionadas demonstraram que, apesar de uma atividade enzimática mais elevada ter sido observada no meio de cultivo padrão contendo óleo de milho e extrato de levedura (8,3 U/mL), fontes alternativas de carbono (óleo de crambe e gordura de frango) e nitrogênio (sulfato de amônio) podem ser utilizadas mantendo alta produção enzimática.
- O meio de cultivo otimizado contendo óleo de crambe (1,75%, v/v), sulfato de amônio (0,5%, m/v), Triton X-100 (0,5%, m/v) e extrato de levedura (0,1%) em água destilada, foi o que apresentou a melhor relação produção x custo, com 4302 U/R\$.

- Celite® 545 e PEO podem ser utilizados como suportes para a imobilização da lipase de *F. oxysporum*. A imobilização em Celite conferiu alto rendimento e capacidade de reutilização à enzima, além de ser material de baixo custo e necessitar de técnica simples e rápida para a imobilização, sendo definidas como melhores condições de imobilização a adição 6 mg/mL de proteína a 4 °C por apenas 2 min. Apesar de não ser possível a sua utilização em meio aquoso, a matriz polimérica de PEO é interessante quando se trata de reações de síntese em meio orgânico, com altos rendimentos e possibilidade de reutilização sem perda de atividade. Os outros suportes avaliados, alginato de cálcio e Octil Sepharose CL-4B, não se mostraram eficientes na imobilização da lipase de *F. oxysporum*.
- Ensaios realizados com a enzima livre demonstraram que a atividade da lipase era de 75 e 78% em pH 9,0 e 10,0, respectivamente, com estabilidade de apenas 30% nos mesmos pH. Porém, quando imobilizada em Celite a atividade manteve-se 100% e a estabilidade subiu para 80 e 60% em pH 9,0 e 10,0, respectivamente.
- Ensaios realizados com a enzima livre demonstraram não haver atividade lipolítica em temperaturas superiores a 60 °C, e estabilidade de apenas 20% a 40 °C. Com a enzima imobilizada em Celite, foi verificada atividade de 40% até 80 °C e estabilidade abaixo de 20% apenas em temperaturas superiores a 70 °C.
- Ensaios realizados com a enzima livre demonstraram que a atividade lipolítica era estável em baixas concentrações de solventes miscíveis em água. Observou-se estabilidade em solventes imiscíveis em água, com ativação da atividade inicial após 1 h de incubação em tolueno, hexano, heptano e isooctano. Com a enzima imobilizada em Celite observou-se grande aumento da estabilidade da enzima em solventes miscíveis em água, mantendo 100% da atividade mesmo nas maiores concentrações. O mesmo foi observado com os solventes imiscíveis em água, com uma maior ativação da atividade lipolítica, chegando ao dobro da atividade inicial.

Conclusão Geral do Trabalho

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que a lipase de *F. oxysporum* pode ser produzida utilizando diferentes fontes lipídicas como indutoras sem perda acentuada na produção da enzima, podendo ser utilizada fonte economicamente viável ou abundante. Dentre as fontes estudadas destacou-se óleo de crambe, oleaginosa sem fins alimentícios e de grande interesse agroindustrial.

As propriedades de alta estabilidade térmica e estabilidade em faixa de pH alcalino, mostram que a enzima tem potencial para a utilização em biocatálise em solventes orgânicos, tanto hidrofóbicos quanto hidrofílicos, e justificaram os esforços realizados na sua produção e principalmente imobilização, que conferiu maior estabilidade e capacidade de reuso. Os resultados sugerem continuidade no estudo desta lipase para uso em reações de síntese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, G. M.; HAMMAD, I. Production of lipase by certain soil fungi. |: Optimization of cultural conditions and genetic characterization of lipolytic strains of *Aspergilli* using protein patterns and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **Online J. Biol. Sci.**, v, 2, p. 639-644, 2002.

ALKAN, H.; BAYSAL, Z.; UYAR, F.; DOGRU, M. Production of lipase by a newly isolated *Bacillus coagulans* under solid-state fermentation using melon wastes. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 136, p. 183-192, 2007.

AL-ZUHAIR, S.; JAYARAMAN, K. V.; KRISHNAN, S.; CHAN, W. H. The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochem. Eng. J.**, v. 30, p. 212-217, 2006.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **B5 passa a ser obrigatório a partir de 1º de janeiro. Economia de divisas será de US\$ 1,4 bi.** Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 14 de fev. 2011.

ANTHONISEN, D. G.; SILVA, S. D. A.; CUNHA JÚNIOR, A. **Perfil de ácidos graxos de óleos vegetais com potencial para a produção de biodiesel.** SIMPÓSIO ESTADUAL DE AGROENERGIA - REUNIÃO TÉCNICA ANUAL DE AGROENERGIA, 1. Embrapa Clima Temperado. Pelotas/RS. Anais SEA. 2007.

ARAI, S.; NAKASHIMA, K.; TANINO, T.; OGINO, C.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Production of biodiesel from soybean oil catalyzed by fungus whole-cell biocatalysts in ionic liquids. **Enz. Microbial Techn.**, v. 46, p. 51-55, 2010.

ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Optimization of medium composition for lipase production by *Candida rugosa* NCIM 3462 using response surface methodology. **Canadian J. Microbiology**, v. 53, p. 643–655, 2007.

ATHAWALE, V.; MANJREKAR, N.; ATHAWALE, M. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by *Pseudomonas cepacia* lipase catalysed resolution of ($\pm$)-menthol. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 16, p. 169-173, 2001.

ATHAYDE-FILHO, P. F.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; MELO, M. L. S.; BORA, P. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIRA, B. F.; WANDERLEY, P. A.; ANTUNES, R. V. **Estudos de Sementes Não-Convencionais Para Obtenção Biodiesel - Caracterização do biodiesel de melão (*Cucumis melo* L).** CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL (RBTB), 1. Brasília/DF. Anais RBTB, p. 223-228, 2006.

ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N. **Optimum experimental designs.** Oxford: Clarendon Press, 1992.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Biorreactors with immobilized lipases. **Enz. Microbial Technol.**, v. 18, p. 392-416, 1996.

BATISTA, L. Recovery of proteins from fish waste products by alkaline extraction. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 210, p. 85-89, 1999.

BCC RESEARCH. **Enzymes in Industrial Applications: Global Markets.** Publicado em jan. 2011. Disponível em <<http://www.bccresearch.com/report/enzymes-industrial-applications-bio030f.html>>. Acesso em 13 fev. 2012.

BECKER, R. Fatty Acids in Food Cereal Grains and Grain Products. In: CHOW, C. K. **Fatty Acids in Foods and Their Health Implications.** CRC Press, 3rd ed., 2007. p. 303-316.

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **J. of Biotechnol.**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of beads. **Biomaterials**, v. 23, p. 3627, 2002.

BIODIESELBR. **A polêmica biocombustíveis versus alimentos**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>. Acesso em 18 de fev. 2012.

BOEKEMA, B.K.H.L.; BESELIN, A.; BREUER, M.; HAUER, B.; KOSTER, M.; ROSENAU, F.; JAEGER, K.E. E TOMMASSEN, J. Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 3838-44, 2007.

BOX, G. E. P. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley. p. 653, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADY, L.; BRZOZOWSKY, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; THIM, L.; MENGE, U. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.

BRANCO, R. V. **Imobilização e caracterização de uma esterase termoestável recombinante de *Pyrococcus furiosus***. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2008. 76p.

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR, B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bio sorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bio sorvente. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 548-553, 2007.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: **Lipases**, p. 1-46. BORGSTROM, B; BROCHMAN, H. L. (Eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984.

BURGESS, L. W.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. GOTT, K. P.; BACKHOUSE, D. **Laboratory manual for *Fusarium* research**. University of Sydney, Sydney-AUS. 1994.

BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. **Bioresource Technol.**, v. 91, n. 1, p. 77-84, 2004.

CAMARGO-DE-MORAIS M. M.; MAIA, M. M. D.; BORBA F. F. S.; MELO, K. G.; SANTOS, C. M. S. O.; REIS, E. R. A.; MORAIS JR, M. A.; LIMA-FILHO, J. L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **World J. Microb. Biotechnol.**, v. 19, p.17, 2003.

CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; MAIA, M. M. D.; BORBA, F. F. S.; MELO, K. G.; SANTOS, C. M. S. O.; REIS, E. R. A.; MORAIS JR., M. A.; LIMA-FILHO, J. L. Oil/mineral-salts medium designed for easy recovery of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* AM3. **World J. of Microbiol. & Biotech.**, v. 19, p. 17-20, 2003.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Bioresource Technol.**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quim. Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRIGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enz. Microbial. Technol.**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CENTENARO, G. S.; FURLAN, V. J. M.; SOARES, L. A. S. Gordura de frango: alternativas tecnológicas e nutricionais. In: Seminário de Ciências Agrárias, 2008, Londrina/PR. **Anais do Seminário de Ciências Agrárias**, v. 29, n.3, p. 619-630, jul./set., 2008.

CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. An extra-cellular alkaline metallolipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824: Purification and biochemical characterization. **Food Chem.**, v. 109, p. 727-736, 2008.

CHANG, S. F.; CHANG, S. W.; YEN, Y. H.; SHIEH, C. J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. **Applied Clay Science**, v. 37, p. 67-73, 2007.

CHEIRSILP, B.; JEAMJOUNKHAW, P.; KITTIKUN, A. H. Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. **J. of Mol. Catal. B: Enz.**, v.59, p. 206-211, 2009.

CHEN, X.; DU, W.; LIU, D. Effect of several factors on soluble lipase-mediated biodiesel preparation in the biphasic aqueous-oil systems. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 2097-2102, 2008.

CHO, A. R.; YOO, S. K.; KIM, E. J. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 186, p. 235-238, 2000.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 20, p. 193–197, 2004.

CLARK, D. S. Can immobilization be exploited to modify enzyme activity? **TIBTECH**, v. 12, p. 439-443, 1994.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. O emprego de Lipases como Agentes de resolução Cinética de Enantiômeros em Síntese Orgânica: Aspectos Gerais Sobre a Influência do Solvente. **Quim. Nova**, v. 22, n. 6, p. 863-864, 1999.

COWAN, D. Industrial enzyme technology. **TIBTECH**, v. 14. p. 177-178, 1996.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Quím. Nova**, v. 32, p. 776-792, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova**, v. 27, 2004.

DENG, L.; XU, X.B.; HARALDSSON, G. G.; TAN, T. W.; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 82, n. 5, p. 341–347, 2005.

DIMITRIJEVIĆ, A.; VELIĆKOVIĆ, D.; BEZBRADICA, D.; BIHELOVIĆ, F.; JANKOV, R.; MILOSAVIĆ, N. Proizvodnja lipaze iz *Pseudozyma aphidis* i utvrđivanje aktivnosti i stabilnosti lipaze u polarnim organskim rastvaračima. **J. Serbian Chemical Soc.**, v. 76, n. 8, p. 1081-92, 2011.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M. A.; SANROMÁN, A. A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*. **Biotechnol. Lett.**, v. 25, p. 1225-1229, 2003.

DUBÉ, M. A.; TREMBLAY, A. Y.; LIU, J. Biodiesel production using a membrane reactor. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 639–647, 2007.

ECHEVENGUÁ, A. **Crambe surge como nova opção para produzir biodiesel.** Disponível em: <<http://www.ecoeacao.com.br>>. Acesso em: 07 de fev. 2011.

EN-SHYH, L.; HUI-CHING, K. Glucose stimulates production of the alkaline-thermostable lipase of the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea*. **Enz. Microbial Technol.**, v. 37, n. 2, p. 261-265, 2005.

FABER, K. Biotransformations in Organic Chemistry. **Springer-Verlag**, Berlin, 1997.

FADIOGLU, S.; SOYLEMEZ, Z. Olive oil hydrolysis by celite immobilized *Candida rugosa* lipase. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 46, p. 3411-3414, 1998.

FÉLIX, E. S.; VALENÇA, R. S. F.; OLIVEIRA, M. E. C. Utilização do óleo residual de frango para obtenção de biodiesel. In: Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 14, 2010, Belém/PA. **Embrapa Amazônia Oriental**. 1 CD-ROM.

FERARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização fisicoquímica e consumo em gerador de energia. **Quim. Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2007. 131p.

FERRÃO-GONZALES, A. D.; SANTANA, F. C. P.; VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; ALVAREZ, H. M.; MOREAU V. H. Produção experimental de biodiesel por transesterificação enzimática. **Diálogos e Ciência**, v. 7, p. 65-78, 2008.

FORTINBRÁS. **Insumos para Indústria Cosmética**. Jaguariúna/SP. Indústria de química fina e especialidades. Disponível em: <<http://www.fortinbras.com.br/produtos1.asp?codigo=31>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **R. Bras. Farm.**, v. 81, p. 48-56, 2000.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V.; CASTRO, H. F. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel; Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Quim. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2277-2281, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 92, p. 495-416, 2001.

FUNGARO, M. H. P.; MACCHERONI JR, W. Melhoramento genético para a produção de enzimas aplicadas à indústria de alimentos . In: MELO, I. S.; INGLIS,

M. C. V.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos genéticos e melhoramento - Microrganismos**. Embrapa, 1ª impressão. São Paulo. 2002, p. 427-453.

GHORBEL, S.; SOUISSI, N.; TRIKI-ELLOUZ, Y.; DUFOSSÉ, L.; GUÉRARD, F.; NASRI, M. Preparation and testing of *Sardinella* protein hydrolysates as nitrogen source for extracellular lipase production by *Rhizopus oryzae*. **World J. Microb. Biotechnol.**, v. 21, n. 1, p. 33-38, 2005.

GHOSH, P. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, S. Microbial lipases: Production and applications. **Sci. Prog.**, v. 79, p. 119-157, 1996.

GOLZ, T. Crambe. **Alternative Agriculture Series**, v. 4, 1993.

GOMES, F. L. S. **Potencial de produção de biodiesel a partir do óleo de frango nas cooperativas do oeste do Paraná**. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel/PR, 2005. 81p.

GOJJARD, L.; VILLENEUVE, P.; BAREA, B.; ECONTE, J.; PINA, M.; CLAUDE, S.; LE PETIT, J.; FERRÉ, E. A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in organic solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 161-167, 2009.

GUIRRA, F. **Uma fonte promissora**. Biodieselbr, Curitiba, ano 2, n. 9, fevereiro-março 2009. 66 p.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure Appl. Chem.**, v. 77, p. 251-262, 2005.

GUNASEKARAN, G.; KOTAY, S. M.; DAS, D. Alkaline lipase production by *Citrobacter freundii* IIT-BT L139. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 44, p. 485-491, 2006.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, V. 64, P. 763–781, 2004.

HAAS, M. J.; McALOON, A. J.; YEE, W. C.; FOGLIA, T. A. A process model to estimate biodiesel production costs. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 671-678, 2006.

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

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; SUZUKI, Y.; YOSHIDA, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Preparation and comparative characterization of immobilized *Aspergillus oryzae* expressing *Fusarium heterosporum* lipase for enzymatic biodiesel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.81, p.637-645, 2008.

HAMEED, B. H.; TAN, I. A. W.; AHMAD, A. L. Preparation of oil palm empty fruit bunch-based activated carbon for removal of 2,4,6-trichlorophenol: Optimization using response surface methodology. **J. Hazardous Mater.**, v. 164, p. 1316-1324, 2009.

HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N. Lipases and lipase catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Cat. Rev. Sci. Eng.**, v. 44, n. 4, p. 499–591, 2002.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enz. Microbial Technol.**, v. 39, p. 235–251, 2006.

HOLM, H. C. Making creams and lipsticks greener. **Biotimes**, v. 1, p. 4-5, 2007.

HOSHINO, T.; SASAKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, T.; YAMANE, T. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, p. 660-664, 1992.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K. E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B. W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 29-63, 1994.

JAERGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JIAN, D. S.; LONG, S. Y.; HUANG, J.; XIAO, H. Y.; ZHOU, J. Y. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochem. Eng. J.**, v. 25, p. 15–23, 2005.

JUNIOR, S. B. G. **Avaliação técnica e econômica da aplicação de óleo vegetal de crame como isolante elétrico em comparação com óleo de soja.** Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento, Curitiba/PR, 2010. 80p.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 91, n. 1, p. 12–15, 2001.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; MATSUMOTO, T.; BAN, K.; KONDO, A.; SHIMADA, Y.; NODA, H.; NOMOTO, F.; OHTSUKA, K.; IZUMOTO, E. E; FUKUDA, H. Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent. **J. of Biosc. and Bioeng.**, v. 88, p. 627-631, 1999.

KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSA, T.; IEFUJII, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochem.**, v. 36, p. 317-324, 2000.

KAUSHIK, R.; MARWAH, R. G.; GUPTA, P.; SARAN, S.; SASO, L.; PARAMAR, V. S.; SAXENA, R. K. Optimization of Lipase Production from *Aspergillus terreus* by Response Surface Methodology and Its Potential for Synthesis of Partial Glycerides Under Solvent Free Conditions. **Indian J Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 456, 462, 2010.

KHARE, S. K.; NAKAJIMA, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. **Food Chemistry**, v. 68, p. 153-157, 2000.

KIRK, O; BORCHERT T. V.; FUGLSANG C. C. Industrial Enzymes applications. **Current Op. Biotechnol.**, v. 13, p. 345–351, 2002.

KIYOTA, H.; HIGASHI, E.; KOIKE, T.; ORITANI, T. Lipase-catalyzed preparation of both enantiomers of methyl jasmonate. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 12, p. 1035-38, 2001.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature insight**, v. 409, p. 241-246, 2001.

KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVEIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 22, p. 275–280, 1998.

KRIEGER, N.; BHATNAGAR, T.; BARATTI, J. C.; BARON, A. M.; LIMA, V. M. G.; MITCHELL, D. NonAqueous Biocatalysis in Heterogeneous Solvent Systems. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, n. 4, p. 279–286, 2004.

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

LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BULL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial Diversity in Tree Canopies of the Atlantic Forest. **Science**. v. 313, p. 1917, 2006.

LEE, K. K. B.; POPPENBORG, L. H.; STUKEY, D. C. Terpene ester production in a solvent phase using a reverse micelle-encapsulated lipase. **Enz. Microb. Technol.**, v. 23, p. 253-260, 1998.

LEE, K. T.; FOGLIA, T. A.; CHANG, K. S. Production of alkyl ester as biodiesel from fractionated lard and restaurant grease. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 79, n. 2, p. 191–195, 2002.

LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochem. Eng. J.**, v. 19, p. 25-31, 2004.

LI, C. Y.; CHENG, C. Y.; CHEN, T. L. Production of *Acinetobacter radioresintens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v.29, p. 258-263, 2001.

LI, X.; HE, X. Y.; LI, Z. L.; WANG, Y. D.; WANG, C. Y.; SHI, H.; WANG, F. Enzymatic production of biodiesel from *Pistacia chinensis bge* seed oil using immobilized lipase. **Fuel**, v. 92, n. 1, p. 89-93, 2012.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochem. Eng. J.**, v. 18, p. 65-71, 2004.

LIMA, V.M.G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium* e sua aplicação em biocatálise em solventes orgânicos**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, 2004. 151p.

LIN, S. F.; CHIOU, C.M.; TSAI, Y.C. Effect of Triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. **Biotechnol. Lett.**, v. 30, p. 959-962, 1995.

LIU, C.H.; LU, W.B.; CHANG, J.S. Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. **Process Biochem.**, v. 41, n. 9, p. 1940-44, 2006.

LIU, Y.; CHEN, D.; YAN, Y.; PENG, C.; XU, L. Biodiesel synthesis and conformation of lipase from *Burkholderia cepacia* in room temperature ionic liquids and organic solvents. **Bioresource Technol.**, v. 102, n. 22, p. 10414-418, 2011.

MAIA, M. M. D.; CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; MORAIS JR, M. A.; MELO, E. H. M.; LIMA FILHO, J. L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 304-309, 1999.

MAIA, M. M. D.; HEASLEY, A.; CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR., M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. L. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Biores. Technol.**, v.76, p. 23-27, 2001.

MALACRIDA, C. R. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê – óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n.2, p. 245-249, 2003.

MANESSE, M. L. M.; COX, R. C.; KOOPS, B. C.; VERHEIJ H. U.; HAAS, G. H. EGMOND, M. R.; VAN DER HIJDEN H. T. W. M.; VLIEGS, J. Cutinase from *Fusarium solani pisi* hydrolyzing triglyceride analogues. Effect of acyl chain length and position in the substrate molecule on activity and enantioselectivity. **Biochem.**, v. 34, p. 6400-6407, 1995.

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, nº 8, p.1942-1947, 2008.

MASE, T.; MATSUMIYA, E.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 59, p. 329-330, 1995.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enz. Microb. Technol.**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CANAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

METZGER, J. O.; BORNSCHEUER, U. Lipids as renewable resources: current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, p. 13-22, 2006.

MIROLIAEI, M.; NEMAT-GORGANI, M. Effect of organic solvents on stability and activity of two related alcohol dehydrogenases; a comparative study. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 169-175, 2002.

MONTESINOS, J. L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Appl. Biochem. and Biotechnol.**, v. 59, p. 25-37, 1996.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 6th ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, 2005.

MONTGOMERY, D. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2^a ed., LTC. Rio de Janeiro, 2003.

MOREIRA, A. B. R.; PEREZ, V. H.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on Silica–PVA composite. **Energy Fuels**, v. 21, p. 3689-94, 2007.

MOURA, J. M. L. N.; RIBEIRO, A. P. B.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A. G. Reator de membrana enzimático e fluidos super críticos: associação de processos. **Quim. Nova**, v. 30, p. 965-969, 2007.

MU, Y.; XIAU, Z. L.; ZHANG, D. J. A combined bioprocess of biodiesel production by lipase with microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. **Biochem. Eng. J.**, v. 40, p. 537-541, 2008.

MUKHERJEE, K. D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. **Biocatal. Biotransf.**, v. 3, p. 277–293, 1990.

MULHOLLAND, K. L.; SYLVESTER, R. W.; DYER, J. A.. Sustainability: waste minimization, green chemistry and inherently safer processing. **Environ. Prog.**, v. 19, n. 4, p. 260–268, 2000.

MUSTRANTA, A.; FORSSEL, P.; POUTANEN, K. Application of immobilized lipases to transesterification and esterification reaction in nonaqueous systems. **Enzyme Microbial Technol.**, v. 15, p. 133-139, 1993.

MYERS R. H.; MONTGOMERY. D. C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. Canada: John Wiley & Sons. 1995.

NAGAO, T.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Increase in stability of *Fusarium heterosporum* lipase. **J. of Mol. Catal. B: Enz.**, v.17, p.125-132, 2002.

NASCIMENTO, M. G.; ZANOTO, S. P.; MELEGARI, S. P.; FERNANDES, L.; SÁ, M. M. Resolution of α -methylene- β -hydroxy esters catalyzed by free and immobilized *Pseudomonas* sp. lipase. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, p. 3111-15, 2003.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed., UNICAMP. Campinas/SP, 2003.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: technical and economical considerations. **European J. of Lipid Science and Techn.**, v. 110, p. 692-700, 2008.

OLIVEIRA, B. H. **Seleção de microrganismos produtores de lipase com características especiais**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis/SP, 2009, 20p.

OLIVEIRA, F. C. C.; SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS, W. L. P. Biodiesel: possibilidades e desafios. **Quim. Nova**, v. 8, p. 3-8, 2008.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanics of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enz. Microbial Technol.**, v. 27, p. 187-204, 2000.

PANAGIOTOU, G.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J.; CHRISTAKOPOULOS, P. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v.18, p. 37-45, 2003.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; KRIEGER, N.; SOCOOL, V. T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p. 119 - 131, Part 2, 1999.

PAPAPARASKEVAS, D.; CHRISTAKOPOULOUS, P.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, p. 397-402, 1992.

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

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; DE CASTRO, H. F.; BRUNO, L. M. Comparação do desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Quím. Nova**, v. 31, p. 35-40, 2008.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, n. 3, p. 281–288, 2007.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pirolisys and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. **Quím. Nova**, v. 25, n. 2, p. 246-253, 2002.

PEREZ, V. H.; DA SILVA, G. S.; GOMES, F. M.; DE CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochem. Eng. J.**, v. 34, n. 1, p. 13-19, 2007.

PIMENTEL, S. A.; TAKEMOTO, E.; KUMAGAI, E. E.; CANO, C. B. Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo e CN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. **Química Nova**, v.31, n. 1, p.31-34, 2007.

PINTO, A. C.; GUARIEIRO, L. L. N.; REZENDE, M. J. C.; RIBEIRO, N. M.; TORRES, E. A.; LOPES, W. A.; PERREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B. Biodiesel: an overview. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, p. 1313, 2005.

PIO, T. F.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enz. and Microb. Technol.**, v. 41, n. 5, p. 613-619, 2007.

PITA, M. C. G.; NETO, E. P.; CARVALHO, P. R.; JUNIOR, C. X. M. Efeito da suplementação de linhaça, óleo de canola e vitamina E na dieta sobre as concentrações de ácidos graxos poliinsaturados em ovos de galinha. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.5, p.925-931, 2006.

PITOL, C. Crambe: forrageira pode ser usada para biodiesel. [29 out. 2007]. **Valor Econômico**. São Paulo.

POGAKU, P.; SURESH, A.; SRINIVAS, P.; REDDY, S. R. Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, p. 882-886, 2010.

PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian J. of Microbiology**, v. 37, p. 505-509, 2006.

QUADROS, C. P.; BICAS, J. L.; BARROS, F. F. C.; DIONÍSIO, A. P.; UENOJO, M.; SANTOS, R.; NERI, I. A.; PASTORE, G. M. *Fusarium oxysporum* alkaline lipase production using industrial residues as alternative medium components. **J. of Biotech.**, v. 131, p. S173, 2007.

QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G. *Pseudomonas* sp. lipase immobilized in polymers versus the use of free enzyme in the resolution of (R,S)-methyl mandelate. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 5225-27, 2002.

RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Lipases: Introduction. In: SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M. **New Lipases and Proteases**. Nova Science Publishers, New York, 2006. p. 1-22.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **Food Sci. and Technol.**, v. 42, p. 985–992, 2009.

RAPP, P. Production, regulation and some properties of lipase activity from *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Enz. Microbiol Technol.**, v. 17, p. 832-838, 1995.

RIFAAT, H. M.; EL-MAHALAWY, A. A.; EL-MENOFY, H. A.; DONIA, S. A. Production, Optimization and Partial Purification of Lipase from *Fusarium oxysporum*. **J. of App. Sci. Environ. Sanitat.**, v. 5, n. 1, p. 39-53, 2010.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. **Planejamento Experimental e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Cárita Editora, 2005.

RODRIGUES, R. C.; VOLPATO, G.; WADA, K.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic Synthesis of Biodiesel from Transesterification Reactions of Vegetable Oils and Short Chain Alcohols. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 85, p. 925–930, 2008.

RÚA, M. L.; DÍAZ-MAURIÑO, T.; FERNÁNDEZ, V. M.; OTERO, C.; BALLESTEROS, A. Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1156, p. 181-189, 1993.

SALAMEH, M.; WIEGEL, J. Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 61, p. 253-283, 2007.

SALIS, A.; PINA, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. **J. Biotechnol.**, v. 119, p. 291-299, 2005.

SALLEH, A. B.; MUSANI, R.; BASRI, M.; AMPON, K.; YUNUS, W. M. Z.; RAZAK, C. N. A. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. **Can. J. Microbiol.**, v. 39, p. 978-981, 1993.

SANTOS, E. P.; VELASCO, M. V.; VILLA, A. L. V.; SIMÕES, S. I. Enzimas na indústria de cosméticos. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em biotecnologia – produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. 506p.

SAWANGPANYA, N.; MUANGCHIM, C.; PHISALAPHONG, M. Immobilization of Lipase on CaCO_3 and Entrapment in Calcium Alginate Bead for Biodiesel Production. **Science Journal J. Ubu.**, v. 1, p. 46-51, 2010.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; SHEBA, W. D. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Meth.**, v. 52, n. 1, p. 1-18, 2003.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent-free system. **Process Biochem.**, v. 42, n. 3, p. 409–414, 2007.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHIMADA, Y.; KOGA, C.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TAKADA, N.; TSUNASAWA, S.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel solvent tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 75, p. 349 - 352, 1993.

SIFOUR, M.; ZAGHLOUL, Z. I.; SAEED, H. M.; BEREKAA, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental designs. **Biotechnol.**, v. 27, p. 330-336, 2010.

SILVA, P. R.; MONTANHER, A. F.; ADÃO, D. C.; ZAGONEL, G. F.; ALVES, L. Z.; DAMBISKI, L.; ADAD, L. B.; VECHIATTO, W. W. D.; SUCHEK, E. M.; COSTA, B. J. **Produção e caracterização físico-química de biodiesel de óleo de crambe.** SIMPÓSIO BRASIL-ALEMANHA, 4. Curitiba/PR. Anais SBA. 2009.

SILVA, W. O. B.; MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochem.**, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, p. 486–520, 2012.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 77, p. 745, 1999.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 33, n. 1, p. :97–103, 2003.

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 44, p. 1328-35, 2009.

SOUZA, L. T. A. **Síntese Enzimática de Biodiesel de *Jatropha curcas* pela Rota Etílica.** Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010. 118p.

STEINKE, G.; KIRCHHOFF, R.; MUKHERJEE, K. D. Lipase-Catalyzed alcoholysis of crambe oil and camelina oil for the preparation of long-chain esters. **JAACS**, v. 77, p. 361-366, 2000.

SUGIHARA, T.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **J. Biochem.**, v. 109, p. 211-216, 1991.

SZTAJER, H.; LÜNSDORF, H.; ERDMANN, H.; MENGE, U.; SCHMIDT, R. Purification and some properties of lipase from *Penicillium simplicissimum*. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1124, p. 253-261, 1992.

TAMERLER, C.; KESHAVERZ, T. Lipolytic enzyme production in batch and fed-batch cultures of *Ophiostoma piceae* and *Fusarium oxysporum*. **J. Chem. Tech. and Biotech.**, v. 75, p. 785-790, 2000.

TAN, T. W.; NIE, K. L.; WANG, F. Production of biodiesel by immobilized *Candida* sp. lipase at high water content. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 128, n. 2, p. 109–116, 2006.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Bioche.**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TAO, S.; PENG, L.; BEIHUI, L.; DEMING, L. E ZUOHU, L. Solid state fermentation of rice chaff for fibrinolytic enzyme production by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnol. Lett.**, v. 19, p. 465-467, 1997.

TAO, S.; PENG, L.; BEIHUI, L.; DEMING, L. E ZUOHU, L. Successive cultivation of *Fusarium oxysporum* on rice chaff for economic production of fibrinolytic enzyme. **Bioproc. and Biosys. Eng.**, v. 18, p. 379-381, 1998.

TASSI, G. S. **Imobilização da lipase de *Fusarium* sp, isolado da Mata Atlântica, e comparação de propriedades bioquímicas entre enzima livre e imobilizada.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis/SP, 2010, 20p.

TREICHEK, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, V. A Review on Microbial Lipases Production. **F. Bioprocess Technol.**, v. 3, p. 182–196, 2010.

TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, J. V. A Review on Microbial Lipases Production. **Food Bioprocess Technol.**, v. 3, n. 2, p. 182-196, 2010.

TRIANAFYLLOU, A. O.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Influence of reaction medium on the enzyme activity in the bioorganic synthesis: behavior of lipase from *Candida rugosa* in the presence of polar additives. **Biotechnol. Appl Biochem.**, v. 17, p. 167-179, 1993.

VARGAS, G. D. L. P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S. C.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 83, p. 47-54, 2008.

VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Synthetic applications of immobilized lipases in polymers. **Quím. Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

VICENTE, G.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysis systems. **Bioresour. Technol.**, v. 92, p. 297, 2004.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 9, p. 113-148, 2000.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Genetic Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

VOSS, J. **As especificações e a qualidade do biodiesel nacional**. O biodiesel. Curitiba, ano II, n. 14, set. de 2006.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochem. Eng. J.**, v. 41, n. 1, p. 30-37, 2008.

WEI, H. N.; WU, B. Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R, S)-Methyl Mandelate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 149, p. 79-88, 2008.

WILKINSON, B.; BACHMANN, B. O. Biocatalysis in pharmaceutical preparation and alteration. **Current Op. Chemical Biology.**, v. 10, p. 1969-1976, 2006.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 3, p. 663-670, 1979.

WU, H. S.; TSAI, M. J. Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, p. 488-493, 2004.

XIE, W.; HUANG, X. Synthesis of biodiesel from soybean oil using heterogeneous KF/ZnO catalyst. **Catal. Lett.**, v. 107, p. 53-59, 2006.

YADAV, G. D.; JADHAV, S. R. Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium. **Microporous Mesoporous Mat.**, v. 86, n. 1-3, p. 215-222, 2005.

YU, H.; WU, J.; CHING, C. B. Enhanced activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase immobilized on macroporous adsorptive resins for ibuprofen resolution. **Biotechnol. Lett.**, v. 26, p. 629-633, 2004.

ZACKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media, **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 8017-8021, 1998.

ZENG, L.; LUO, K.; GONG, Y. Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier. **J. Mol. Catal., B Enzym.**, v. 23, p. 24–30, 2006.

ZHANG, J.; HOU, Z.; YAO, C.; YU, Y. Purification and properties of a lipase from a *Bacillus* strain for catalytic resolution of (R)-Naproxen. **J. Mol. Catal. B: Enz.**, v. 18, p. 205-214, 2002.