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

PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 EM
CULTIVO SUBMERSO

DANIELA FLAVIA MACHADO TURATI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia aplicada).

Junho - 2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



**PURIFICAÇÃO, IMOBILIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 EM
CULTIVO SUBMERSO**

DANIELA FLAVIA MACHADO TURATI

Orientadora: Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia aplicada).

**Rio Claro
2015**

547.758 Turati, Daniela Flavia Machado
T929p Purificação, imobilização e caracterização bioquímica de
lipase produzida por *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI
1583 em cultivo submerso / Turati, Daniela Flavia Machado. -
Rio Claro, 2015
147 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Eleonora Cano Carmona

1. Enzimas. 2. Triacilglicerol acil-hidrolase. 3. Fungo
filamentoso. 4. Interação hidrofóbica. 5. Ácidos graxos
ômega-3. 6. Agregados bimoleculares. I. Título.

Dedico este trabalho às minhas famílias:
a de sangue e a que o destino escolheu pra mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lola e Ulisses, por todo amor dedicado, base e educação, mas, principalmente, pela confiança e liberdade.

À minha vó Flora, por todo amor e dedicação, e por todas as orações e energias positivas que curam qualquer mal.

Aos meus irmãos, Luiz e Juliana, pelo amor e parceria únicos que compartilhamos.

À família CBI09, razão da minha alegria rio clarense. Serei eternamente grata pela oportunidade de dividir quase 7 anos com vocês.

À Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona, por acreditar em mim e não medir esforços para que o trabalho fosse realizado da melhor maneira possível, por todo carinho, atenção e confiança.

Ao Prof. Dr. Jose Manuel Guisan, pela supervisão e parceira no desenvolvimento deste trabalho, por me receber em seu laboratório em Madri de braços abertos e com sorriso no rosto, por me animar diante de um resultado aparentemente ruim e por confiar no meu trabalho.

À Dra. Gloria Fernandez-Lorente, pela co-supervisão em Madri, por toda atenção dispendida e por ser um exemplo de pesquisadora, pessoa e mulher guerreira.

Ao Dr. Benevides Costa Pessela, por abrir as portas de seu laboratório em Madri e por ter sido um pai do outro lado do mundo.

À Cárol, Juliana e Carmen, por todo o apoio no laboratório, todas as conversas jogadas fora e todos esses anos de excelente convivência. Se não fosse por vocês, metade deste trabalho não seria concretizada. Muito obrigada.

Ao Anderson, técnico do Departamento de Biologia da UNESP-RC, por todo auxílio com as eletroforeses.

Ao Prof. Dr. Rubens Monti, por me receber em seu laboratório e pelo treinamento em imobilização de enzimas antes da minha ida à Madri.

À Dra. Andrea Santos, orientada do Prof. Dr. Rubens Monti, por toda atenção durante meu treinamento em Araraquara. Seus ensinamentos foram indispensáveis para minha ida à Madri.

Ao Dr. César Terrasan, por todo apoio e amizade antes, durante e depois de Madri.

Aos amigos do CIAL Junior, Eliane e Rosana pela amável convivência diária no laboratório e por todos os momentos de descontração, viagens, comilanças e andanças pelo velho mundo.

À Sonia Moreno-Pérez, por todo acolhimento e ajuda no laboratório, sempre extremamente solícita e única.

À Livia Souza, pelo encontro maravilhoso nesta vida. Agradeço imensamente todo o conhecimento e carinho compartilhado.

Ao Thiago Costa, pelo encontro do encontro e por marcar esta fase da minha vida de maneira tão singular.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP pela concessão das bolsas de estudo.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira com o desenvolvimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Hidrólise sequencial dos grupos acila de um triacilglicerídeo catalisada por lipase.....	16
Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.....	17
Figura 3 – Estrutura secundária comum de lipases.....	18
Figura 4 – Lipase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> nas conformações (A) aberta e (B) fechada.....	19
Figura 5 – Conidióforo de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 cultivado em meio sólido aveia-ágar por oito dias.....	24
Figura 6 – Métodos de imobilização de enzimas.....	34
Capítulo 1 - PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LIPASE PRODUZIDA POR <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583	
Figura 1 – Hidrólise do substrato sintético para-nitrofenil palmitato catalisada por lipase.....	44
Figura 2 – Influência do pH de reação sobre a atividade lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.....	52
Figura 3 – Influência da temperatura de reação sobre atividade lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.....	54
Figura 4 – Gráfico de Arrhenius para a reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> presente no filtrado de cultura.....	56
Figura 5 – Influência do pH sobre a estabilidade da lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.....	57
Figura 6 – Influência da temperatura sobre a estabilidade da lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 presente no filtrado bruto.....	58
Figura 7 – Estrutura molecular do dodecil sulfato de sódio (a) e do deoxicolato de sódio (b).....	61
Figura 8 – Estrutura molecular de: TX-100 (a); Tween 20 (b); e Tween 80 (c).....	61
Figura 9 – Mecanismo de ativação de lipases por detergentes não iônicos.....	62
Figura 10 – Precipitação da lipase de <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583 presente no filtrado bruto com sulfato de amônio pulverizado.....	63

Figura 11 – Teste em tubo para seleção da resina a ser utilizada na cromatografia de interação hidrofóbica para a purificação da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 presente no filtrado bruto dialisado.....	65
Figura 12 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 em coluna de interação hidrofóbica com a resina Octil Sepharose.....	66
Figura 13 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 em coluna de exclusão molecular.....	67
Figura 14 – Perfil eletroforético SDS-PAGE de proteínas padrões (1) e da lipase parcialmente purificada (2) em gel gradiente com 8 a 18 % de poliacrilamida.....	68
Figura 15 – Zimograma da amostra de lipase parcialmente purificada em gel gradiente de 8 a 18 % de poliacrilamida.....	68
Figura 16 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 em coluna de interação hidrofóbica com a resina Fenil Sepharose.....	70
Figura 17 - Perfil eletroforético SDS-PAGE em gel gradiente com 8 a 18 % de poliacrilamida.....	71
Figura 18 – Influência do pH de reação sobre atividade lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 purificada.....	73
Figura 19 – Influência da temperatura de reação sobre atividade lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 purificada.....	73
Figura 20 – Gráfico de Arrhenius para a reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta purificada.....	74
Figura 21 – Estabilidade ao pH da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 purificada.....	75
Figura 22 – Estabilidade térmica da lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 purificada.....	76
Figura 23 – Atividade lipase de <i>Penicillium</i> sect. Gracilenta CBMAI 1583 purificada sobre diferentes substratos sintéticos.....	81
Figura 24 – Hidrólise de triacetina por esterase hepática de cavalo e lipase pancreática suína: atividade enzimática em função da concentração do substrato.....	82

Figura 25 – Cinética enzimática de lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 com o substrato p-nitrofenil palmitato. (a) Amostra com TX-100; (b) amostra sem TX-100.....83

Chapter 2 - *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 LIPASE IMMOBILIZATION BY DIFFERENT STRATEGIES, STABILIZATION AND CHARACTERIZATION OF DERIVATIVES

Figure 1 - Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of proteins adsorbed on hydrophobic supports.....102

Figure 2 – Reuse of (a) octyl and (b) phenyl derivatives towards pNPP hydrolysis.....103

Figure 3 – Hydrophobic derivatives stability in different pH in aqueous media.....105

Figure 4 – Mild CNBr derivative stability in different pH in aqueous media.....106

Figure 5 – Hydrophobic derivatives thermal stability at 50 °C.....107

Figure 6 – Octyl, Toyopearl Butyl and mild CNBr derivatives thermal stability at 60°C.107

Figure 7 – Butyl, Phenyl and Octyl derivatives thermal stability at 70 °C.....108

Figure 8 – CNBr derivatives stability in different pH in aqueous media.....120

Figure 9 – Thermal stability of CNBr derivatives at 60 °C.....121

Figure 10 - Schematic representation of how the different CNBr derivatives may be immobilized: (a) mild CNBr and (b) CNBr 2 h and CNBr 6 h.....122

Figure 11 – Time-course of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase immobilization on glyoxyl agarose under different conditions.....125

Figure 12 - Schematic representation of the immobilization of monomeric and dimeric lipases on glyoxyl supports.....126

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Purificação e caracterização bioquímica de diferentes lipases microbianas.....27

Tabela 2 – Aplicações biotecnológicas de lipases comerciais imobilizadas por diferentes técnicas e em diferentes suportes.....36

Capítulo 1 - PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583

Tabela 1 – pH e temperatura ótimos de atividade de lipases de fungos do gênero *Penicillium*.....55

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da estabilidade térmica de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.....59

Tabela 3 – Influência de emulsificantes e surfactantes sobre estabilidade de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.....60

Tabela 4 – Primeira estratégia de purificação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583.....67

Tabela 5 – Segunda estratégia de purificação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583.....71

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da estabilidade térmica de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 purificada.....76

Tabela 7 – Efeito de substâncias sobre a atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 purificada.....77

Tabela 8 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 purificada.....78

Tabela 9 – Estabilidade de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 em diferentes solventes orgânicos.....79

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos aparentes da lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583.....83

Chapter 2 - *Penicillium* sect *Gracilenta* CBMAI 1583 LIPASE IMMOBILIZATION BY DIFFERENT STRATEGIES, STABILIZATION AND CHARACTERIZATION OF DERIVATIVES

Table 1 - Immobilization parameters of <i>Penicillium</i> sect <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583 lipase on hydrophobic supports.....	100
Table 2 - Kinetic parameters of hydrophobic derivatives thermal stability.....	109
Table 3 – Octyl derivative stability in different organic media.....	110
Table 4 - Amount of Triton X-100 necessary to fully release lipase adsorbed on different hydrophobic supports.....	111
Table 5 – Parameters of fish oil hydrolysis with hydrophobic and mild CNBr derivatives.....	113
Table 6 – Hydrolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases on hydrophobic supports.....	114
Table 7 - Ratio between the release of EPA versus the release of DHA during the first stages of the hydrolysis of sardine oil catalyzed by lipases immobilized on Octyl-Sepharose.....	115
Table 8 - Parameters of fish oil ethanolysis with hydrophobic derivatives.....	116
Table 9 - Immobilization parameters of <i>Penicillium</i> sect <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583 lipase on ion exchange supports.....	118
Table 10 - Immobilization parameters of <i>Penicillium</i> sect <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583 lipase on CNBr-activated agarose.....	119
Table 11 – Kinetics parameters of CNBr derivatives thermal stability.....	121
Table 12 - Hydrolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases on CNBr derivatives.....	123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
<u>2.1 Lipases: estrutura e ativação interfacial</u>	16
<u>2.2 Lipases e outras carboxilesterases</u>	20
<u>2.3 Fontes produtoras de lipases</u>	21
<u>2.4 Purificação e caracterização de lipases microbianas</u>	25
<u>2.5 Aplicações industriais das lipases</u>	30
<u>2.6 Imobilização de lipases microbianas</u>	33
3 Capítulo 1 - PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LIPASE PRODUZIDA POR <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 OBJETIVOS.....	42
<u>2.1 Objetivos gerais</u>	42
<u>2.2 Objetivos específicos</u>	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
<u>3.1 Linhagem: preservação, manutenção e cultivo</u>	43
<u>3.2 Obtenção do filtrado de cultura</u>	44
<u>3.3 Determinação da atividade enzimática</u>	44
<u>3.4 Determinação de proteínas</u>	45
<u>3.5 Caracterização bioquímica parcial da lipase presente no filtrado de cultura</u>	45
3.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade.....	45
3.5.2 Estabilidade em diferentes valores de pH e estabilidade térmica.....	45
3.5.3 Estabilidade na presença de emulsificantes e surfactantes.....	46
<u>3.6 Purificação da lipase produzida por <i>Penicillium</i> sect. <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583</u>	46
3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio.....	46
3.6.2 Ensaio do teste em tubo para seleção da resina hidrofóbica e das condições de ligação e liberação da enzima.....	47
3.6.3 Cromatografias de interação hidrofóbica.....	47

3.6.4 Cromatografia de exclusão molecular.....	48
3.6.5 Remoção do detergente TX-100 para caracterização eletroforética.....	48
3.6.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	48
3.6.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição não denaturante (zimograma).....	49
<u>3.7 Caracterização bioquímica da lipase purificada</u>	50
3.7.1 Estimativa da massa molar.....	50
3.7.2 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade.....	50
3.7.3. Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica.....	50
3.7.4 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre atividade enzimática.....	50
3.7.5 Estabilidade em solventes orgânicos.....	51
3.7.6 Especificidade por substratos sintéticos.....	51
3.7.7 Cinética enzimática.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
<u>4.1 Caracterização bioquímica parcial da lipase presente no filtrado de cultura</u>	52
4.1.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade.....	52
4.1.2 Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica.....	56
4.1.3 Estabilidade na presença de emulsificantes e surfactantes.....	59
<u>4.2 Purificação da lipase produzida por <i>Penicilium</i> sect. <i>Gracilenta</i> CBMAI 1583</u>	62
4.2.1 Precipitação com sulfato de amônio.....	63
4.2.2 Ensaio do teste em tubo para seleção da resina hidrofóbica e das condições de ligação e liberação da enzima.....	64
4.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica com Octil Sepharose.....	65
4.2.4 Cromatografia de exclusão molecular.....	66
4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	67
4.2.6 Cromatografia de interação hidrofóbica com Fenil Sepharose.....	69
<u>4.3 Caracterização bioquímica da lipase purificada</u>	72
4.3.1 Estimativa da massa molecular.....	72
4.3.2 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade.....	72
4.3.3. Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica.....	74

4.3.4 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre atividade enzimática.....	76
4.3.5 Estabilidade em solventes orgânicos.....	79
4.3.6 Especificidade por substratos sintéticos.....	80
4.3.7 Cinética enzimática.....	81
5 CONCLUSÕES.....	85
4 Chapter 2 - <i>Penicillium</i> sect <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583 LIPASE IMMOBILIZATION BY DIFFERENT STRATEGIES, STABILIZATION AND CHARACTERIZATION OF DERIVATIVES.....	87
ABSTRACT.....	88
1 INTRODUCTION.....	89
2 OBJECTIVES.....	91
<u>2.1 General objectives</u>	91
<u>2.2 Specific objectives</u>	91
<u>3.1 <i>Penicillium</i> sect <i>Gracilentia</i> CBMAI 1583: strain, maintenance and lipase production</u>	92
<u>3.2 Enzyme activity assay</u>	92
<u>3.3 Protein determination</u>	93
<u>3.4 Lipase immobilization</u>	93
3.4.1 Adsorption on hydrophobic supports.....	93
3.4.2 Adsorption on ion exchange supports.....	94
3.4.3 Covalent attachment to CNBr-activated Sepharose.....	95
3.4.4 Multipoint covalent attachment to glyoxyl-agarose.....	95
3.4.5 Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)..	96
<u>3.5 Derivatives characterization</u>	96
3.5.1 Derivatives reuse.....	96
3.5.2 Stability in different pH in aqueous media.....	97
3.5.3 Thermal stability.....	97
3.5.4 Stability in different organic media.....	97
3.5.5 Lipase desorption from hydrophobic supports.....	98
<u>3.6 Lipase application in the production of omega-3 fatty acids and ethyl esters</u>	98
3.6.1 Fish oil hydrolysis in aqueous media.....	98

3.6.2 Fish oil ethanolsis in organic media.....	99
4 RESULTS AND DISCUSSION.....	100
<u>4.1 Hydrophobic derivatives.....</u>	100
4.1.1 Immobilization.....	100
4.1.2 Characterization.....	102
4.1.2.1 <i>Derivatives reuse.....</i>	102
4.1.2.2 <i>Stability in different pH in aqueous media.....</i>	104
4.1.2.3 <i>Thermal stability.....</i>	106
4.1.2.4 <i>Stability in different organic media.....</i>	109
4.1.2.5 <i>Lipase desorption from hydrophobic supports.....</i>	111
4.1.3 Hydrolysis of fish oil in aqueous media.....	112
4.1.4 Ethanolsis of fish oil in organic media.....	115
<u>4.2 Ion exchange derivatives.....</u>	117
<u>4.3 CNBr activated agarose derivatives.....</u>	118
4.3.1 Immobilization.....	118
4.3.2 Characterization.....	120
4.3.2.1 <i>Stability in different pH in aqueous media.....</i>	120
4.3.2.2 <i>Thermal stability.....</i>	121
4.3.2.3 <i>Hydrolysis of fish oil in aqueous media.....</i>	122
4.3.3 Glyoxyl agarose derivatives.....	123
5 CONCLUSIONS.....	127
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	130
REFERÊNCIAS.....	133

INTRODUÇÃO

As enzimas são, em sua grande maioria, proteínas, capazes de acelerar uma reação metabólica através de seu poder de catálise, o qual é essencial para a manutenção da vida em uma escala de tempo útil (NELSON; COX, 2014). Com o rápido desenvolvimento da enzimologia e aumento da demanda por enzimas específicas para usos comerciais, surgiu o mercado industrial de enzimas. As enzimas mais comercializadas são proteases, carboidrases e lipases, sendo utilizadas, principalmente, nas indústrias de alimentos, de ração animal e de detergentes (VOCUS, 2011).

Em 2012, o crescimento do mercado mundial de enzimas era estimado em 7 % ao ano, com projeção de alcançar a casa dos US\$ 8,0 bilhões em 2015 (LI et al., 2012). Em relação às enzimas com aplicações industriais, esta fatia do mercado foi avaliada em US\$ 4,5 bilhões em 2012 e em US\$ 4,8 bilhões em 2013, e a expectativa é que alcance US\$ 7,1 bilhões em 2018 (BCC RESEARCH, 2014). Em 2009, o Brasil era o responsável por cerca de 60 % da demanda de enzimas da América Latina, o que representava 3,4 % da demanda mundial. No entanto, a maior parte, 86 %, se refere à importação, enquanto apenas 14 % são destinados à exportação. Esses dados refletem o atraso tecnológico do país na área enzimática e a falta de incentivos e estratégias para a produção de biocatalisadores no país (MONTEIRO; SILVA, 2009).

Em 2007, o Brasil instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB) e criou o Comitê Nacional de Biotecnologia através do decreto nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. A PDB “tem por objetivo o estabelecimento de ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores, o estímulo à maior eficiência da estrutura produtiva nacional, o aumento da capacidade de inovação das empresas brasileiras, a absorção de tecnologias, a geração de negócios e a expansão das exportações”. Este decreto estabelece o desenvolvimento da tecnologia enzimática como alvo estratégico e área prioritária, além de delegar a responsabilidade de criação de programas e políticas para o desenvolvimento da área industrial de enzimas à Casa Civil da Presidência da República e ao Ministério de Ciência e Tecnologia. Desta maneira, espera-se que o Brasil se torne mais competitivo na produção enzimática a longo prazo, diminuindo a importação.

Dentre as enzimas industriais mais utilizadas estão as lipases. As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma importante classe de enzimas, cujo papel fisiológico é o de hidrolisar triacilgliceróis, formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres, bem como sintetizar novos triacilgliceróis através da esterificação e transesterificação de ácidos graxos de cadeias longas (SVENDSEN, 2000; SNELLMAN; COLWELL, 2004). Além deste papel principal no metabolismo energético dos seres vivos, as lipases também estão relacionadas com a sinalização celular (SPIEGEL et al., 1996), processos inflamatórios (TJOELKER et al., 1995), ações infecciosas de micro-organismos (HUBE et al., 2000) e até com a virulência de alguns vírus (GIROD et al., 2001).

As lipases são enzimas ubíquas, sendo que aquelas produzidas por micro-organismos despertaram grande interesse industrial por duas principais razões: são capazes de catalisar diversas reações, como hidrólise, esterificação, alcoólise e lactonização (GOSH et al., 1996; REETZ, 2002; PAQUES; MACEDO, 2006); e os micro-organismos são de fácil manipulação, requerem pouco espaço de armazenamento, constituem um acervo pouco explorado do patrimônio genético e produzem enzimas com características distintas umas das outras. Dentre as fontes microbianas de lipases de interesse industrial e biotecnológico, destacam-se fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SHARMA et al., 2001). Os fungos os mais são explorados para a produção de enzimas por secretarem grandes quantidades de proteínas no meio extracelular. Cerca de 100.000 espécies de fungos são descritas na literatura (KIRK et al., 2008), sendo que o número estimado de espécies existentes é de, pelo menos, 1,5 milhão, podendo ser de até 3 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2012). Esta diversidade é extraordinária, o que motiva a busca por novas fontes fúngicas produtoras de lipases.

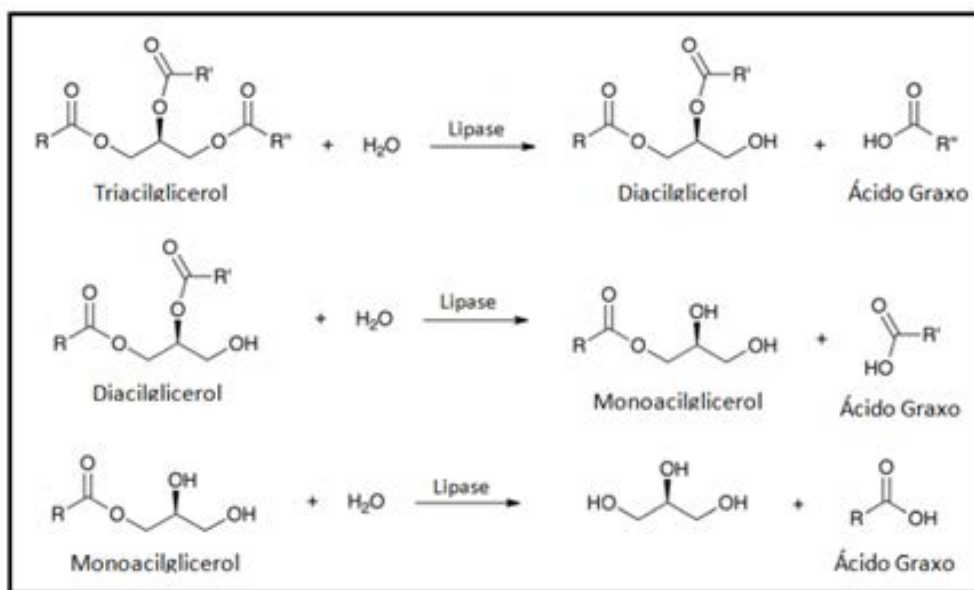
O presente trabalho visou purificar, imobilizar e caracterizar as propriedades de uma lipase extracelular produzida por um fungo filamentoso do gênero *Penicillium* ainda não estudada, inserindo-se no contexto econômico, tecnológico, industrial e de diversidade microbiana ilustrado anteriormente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lipases: estrutura e ativação interfacial

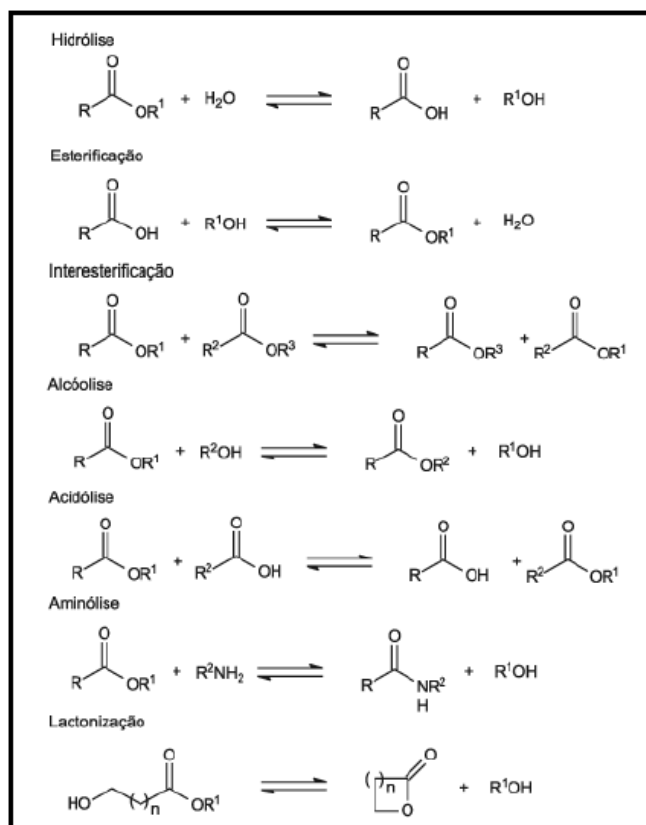
As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que atuam nas ligações ésteres de numerosos compostos, operando preferencialmente sobre triacilgliceróis. A hidrólise catalisada por lipases ocorre na interface lipídeo/água e pode ser total ou parcial, sendo liberados diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol (**Figura 1**) (JAEGER; REETZ, 1998; RIBEIRO et al., 2011; VAHKLU; KOUR, 2006). Essas enzimas apresentam grande interesse industrial, tanto em reações de hidrólise quanto em síntese orgânica, uma vez que são capazes de catalisar também reações de síntese em meios reacionais com restrição de água ou na presença de solventes orgânicos, como esterificação, interesterificação e transesterificação (**Figura 2**) (CASTRO et al., 2004).

Figura 1 – Hidrólise dos grupos acila de um triacilglicerídeo catalisada por lipase.



Fonte: Adaptado de WORTHINGTON BIOCHEM. CO. Acesso em 04 out 2012.

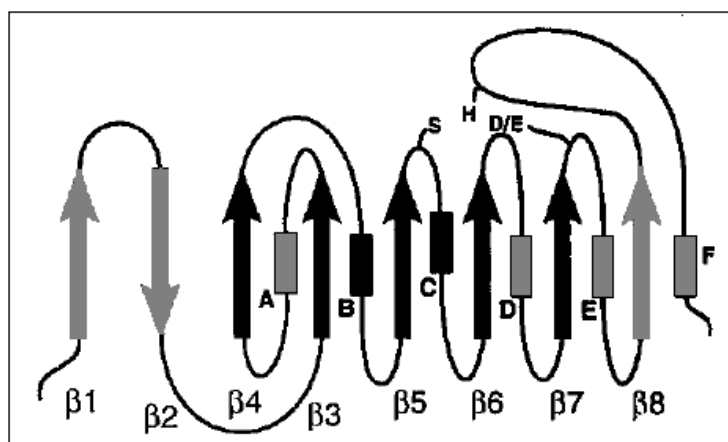
Figura 2 – Reações catalisadas por lipases.



Fonte: PAQUES; MACEDO, 2006.

A estrutura das lipases é peculiar e a relação entre estrutura, função e mecanismo catalítico é alvo de intensos estudos. Neste contexto, informações relevantes estão disponíveis na base de dados LED (*lipase engineering database*), a qual reúne 24.783 sequências gênicas correspondentes a 18.585 proteínas, disponibiliza 656 estruturas proteicas determinadas experimentalmente e fornece acesso a 22 estruturas de lipases publicadas (GUPTA et al. 2015). A maioria das lipases pertence à família das α/β hidrolases, apresentando baixa identidade entre a sequência primária de aminoácidos, mas alta similaridade em relação ao dobramento (ANOBOM et al., 2014). A estrutura terciária de lipases é formada por um núcleo central composto, geralmente, por sete folhas β paralelas e uma folha β anti-paralela, conectadas por α -hélices (SCHRAG; CYGLER, 1997; JAEGER; REETZ, 1998). O fragmento mínimo comum a todas as lipases são cinco folhas β e duas α -hélices (**Figura 3**) (CYGLER; SCHRAG, 1997).

Figura 3 – Estrutura secundária comum de lipases.



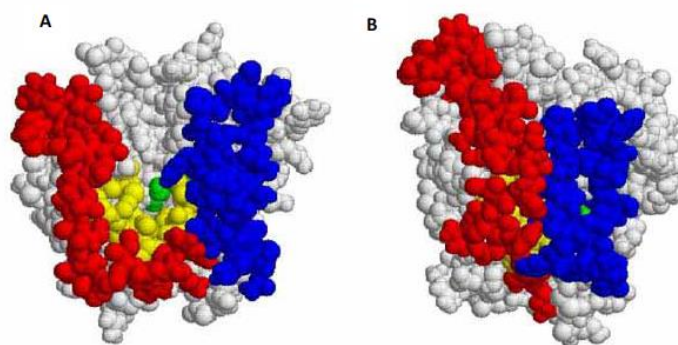
Setas representam folhas β e retângulos representam α -hélices. Elementos mostrados em preto ocorrem em todas as lipases (folhas $\beta 3$ a $\beta 7$ e α -hélices B e C). Elementos mostrados em cinza ocorrem na maioria das lipases. Fonte: adaptado de SCHRAG; CYGLER, 1997; e CYGLER; SCHRAG, 1997.

O sítio ativo das lipases contém uma tríade catalítica altamente conservada, composta por resíduos de serina, ácido aspártico ou glutâmico e histidina (OLLIS et al., 1992; HOLMQUIST, 2000). Esses resíduos estão localizados em posições específicas na estrutura secundária: o resíduo de serina após a folha $\beta 5$, o resíduo ácido após a folha $\beta 7$ e o resíduo de histidina após a folha $\beta 8$ (CYGLER; SCHRAG, 1997). A tríade catalítica está localizada no interior de uma cavidade hidrofóbica superficial ou profunda, chamada de cavidade do oxianion (JAEGER et al., 1999). Esta cavidade é, geralmente, coberta por uma unidade oligopeptídica helicoidal anfipática chamada de tampa (ou *lid*), a qual isola os resíduos hidrofóbicos do ambiente hidrofílico (REETZ, 2002; HOU; SHIMADA, 2009; GUPTA et al., 2015).

A tampa que recobre o sítio ativo é formada por uma ou mais α -hélices que variam na quantidade de aminoácidos, posição na enzima, mobilidade e complexidade (CYGLER; SCHRAG, 1997; GUPTA et al., 2015). A presença da tampa é uma característica exclusiva de lipases e está relacionada com o mecanismo de ação dessas enzimas. Quando em contato com uma interface polar/apolar, a tampa sofre uma mudança conformacional que expõe o sítio ativo ao substrato, possibilitando a catálise (REETZ, 2002; HOU; SHIMADA, 2009). Este fenômeno é conhecido como ativação interfacial e explica porque a grande maioria das lipases tem sua atividade aumentada sobre substratos insolúveis em água (SARDA;

DESNUELLE, 1958; NOINVILLE et al., 2002). Por esse motivo, as lipases podem ocorrer em duas conformações: fechada e inativa, e aberta e ativa. A conformação fechada é caracterizada por um sítio ativo desocupado e coberto pela tampa, enquanto a conformação aberta se caracteriza pelo sítio ativo acessível ao substrato devido ao deslocamento da tampa. A superfície interna da tampa e a cavidade do sítio ativo são predominantemente hidrofóbicas e a superfície externa da tampa é razoavelmente hidrofílica. Dessa maneira, em soluções aquosas há um equilíbrio entre as conformações aberta e fechada, com predominância da conformação fechada (**Figura 4**) (CYGLER; SCHRAG, 1997). Além de controlar o acesso dos substratos ao centro catalítico das lipases, a região da tampa é determinante para a atividade, especificidade e seletividade dessas enzimas (BROCCA et al., 2003; SECUNDO et al., 2006). Entretanto, nem todas as lipases são dotadas de ativação interfacial, como a lipase B de *Candida antarctica*, a qual não possui o escudo anfipático que protege o sítio ativo, impossibilitando a mudança conformacional responsável pelo fenômeno da ativação interfacial (CYGLER; SCHRAG, 1997; HOU; SHIMADA, 2009; GUPTA et al., 2015).

Figura 4 – Lipase de *Pseudomonas aeruginosa* nas conformações (A) aberta e (B) fechada.



Resíduos de aminoácidos que constituem a tampa representados em vermelho e azul; resíduos hidrofóbicos da cavidade do sítio ativo representados em amarelo; tríade catalítica representada em verde. Fonte: CHERUKUVADA et al., 2005.

Uma característica das lipases associada à presença da tampa que recobre o sítio é a formação de agregados moleculares não covalentes. Nesses agregados, os centros ativos hidrofóbicos dos monômeros, expostos pelo deslocamento da tampa na interface lipase/lipase, entram em contato. A estabilização da forma aberta e ativa dos monômeros em contato formam agregados com novos centros ativos, os quais podem apresentar

características catalíticas distintas dos monômeros (PALOMO et al., 2005; WILSON et al., 2006; LIMA et al., 2013). O comportamento de agregação pode ser estudado comparando a massa molecular da enzima em condições desnaturantes, como SDS-PAGE, e em condições nativas, como cromatografia de exclusão molecular. Liou et al. (1998) verificaram a presença de quatro picos com atividade lipase de *Candida rugosa*, pela eluição de uma amostra sem detergente em coluna Sephadex G200, com massas moleculares de 440, 240, 130 e 60 kDa, enquanto a análise em gel de eletroforese desnaturante desses picos apresentou uma única banda de 60 kDa. Outra estratégia é a imobilização de lipases no suporte glioxil-agarose em pH abaixo de 10. Nesta condição, apenas enzimas com mais de um grupo amino terminal são imobilizadas, como enzimas multiméricas ou agregados moleculares. Monômeros apresentam apenas um amino terminal disponível para reagir e, portanto, não podem ser imobilizados neste suporte (LIMA et al., 2013). Nesse trabalho, esses autores demonstraram que a lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) forma agregados bimoleculares através da imobilização covalente multipontual em glioxil-agarose em pH 8,5. Desta maneira, foi possível imobilizar os dímeros de PFL que se formam na ausência do detergente Triton X-100, mas não a forma monomérica predominante na presença deste detergente.

2.2 Lipases e outras carboxilesterases

Além das lipases, outras enzimas também são capazes de hidrolisar ligações ésteres, como esterases (E.C. 3.1.1.1) e cutinases (E.C. 3.1.1.74) (JAEGER et al., 1999; CHAHINIAN et al., 2002; PIO et al. 2008). As cutinases são enzimas hidrolíticas que degradam a cutina, um polímero encontrado na cutícula de plantas superiores composto majoritariamente por ácidos graxos C16 e C18 contendo grupos hidroxilas e epóxidos. A ligação éster é predominante na estrutura da cutina, entretanto ligações éter e pontes de peróxido também são encontradas. O papel da cutina é proteger a planta das invasões dos patógenos e sua degradação enzimática é uma das primeiras etapas no processo de infecção (CARVALHO et al., 1999). Neste sentido, muitos autores tentaram classificar as lipases, sendo que até hoje a distinção entre lipase e outras enzimas com características lipolíticas é alvo de controvérsias.

Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram uma diferenciação entre lipases e esterases baseada na ativação de lipases na presença de substratos insolúveis em água e

emulsionados, ou seja, através da propriedade de ativação interfacial das lipases. Esses autores estudaram a hidrólise de triacetina por esterase hepática de cavalo e por lipase pancreática suína e observaram que a esterase é mais ativa quando o substrato é solúvel, enquanto a lipase apresenta baixa atividade sobre o substrato solúvel, mas aumento significativo da atividade após o limite de solubilidade do substrato.

Nos anos 90, quando as estruturas tridimensionais das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY et al., 1990), *Geotrichum candidum* (SCHRAG et al., 1991) e de pâncreas de humanos (WINKLER et al., 1990) foram determinadas e a presença da tampa que recobre o sítio ativo foi descoberta, esse também passou a ser um critério distintivo entre lipases e esterases. As enzimas que apresentavam uma tampa cobrindo o sítio catalítico e o fenômeno de ativação interfacial eram classificadas como lipases verdadeiras, enquanto as enzimas que não apresentavam tampa e hidrolisavam apenas substratos solúveis eram classificadas como esterases. No entanto, algumas lipases que possuem tampa sobre o sítio ativo não estão sujeitas à ativação interfacial, como as lipases de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* B (JAEGER; REETZ, 1998). Por outro lado, algumas lipases não apresentam a tampa, como as cutinases, e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (CYGLER; SCHRAG, 1997). Além disso, a ocorrência ou não da ativação interfacial pode ser influenciada pelas condições experimentais e pelos substratos utilizados (FERRATO et al., 1997).

As lipases têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam triacilgliceróis de cadeia longa (cadeias com mais de 10 átomos de carbono). Jaeger e Eggert definiram, em 2002, uma lipase ‘verdadeira’ como aquela que é capaz de hidrolisar e sintetizar acilgliceróis de cadeia longa, cujo substrato padrão é o trioleilglicerol. Nesse sentido, enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são tidas genericamente como esterases (JAEGER et al., 1994; VERGER, 1997; JAEGER et al., 1999; FOJAN et al., 2000). É válido ressaltar que a maioria das lipases é capaz de hidrolisar os substratos das esterases, enquanto o inverso não ocorre (JAEGER et al., 1999).

2.3 Fontes produtoras de lipases

As lipases são enzimas ubíquas, sendo produzidas pelos organismos mais basais até os eucariotos mais derivados, podendo ser obtidas a partir de tecidos animais, vegetais ou através do cultivo de micro-organismos. Estudos com lipases animais são relatados na literatura desde várias décadas atrás, como os reportados por Sarda e Desnuelle em 1958, com lipase pancreática suína. Em geral, as lipases animais são classificadas em três grandes grupos: digestivas, de tecidos e do leite; participando, principalmente, da digestão de triacilgliceróis, e absorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas (ZOUARI et al., 2005; DEETH, 2006). Já nas plantas, as lipases são encontradas em: sementes de oleaginosas, como pinhão-manso (*Jatropha curcas*), mamona (*Ricinus communis*), canola (*Brassica napus*) e cominho negro (*Nigella sativa*); sementes de cereais, como arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum L.*); e no látex de algumas plantas como o mamão (*Papaya carica*). (MOUNGUENGUI et al., 2013). O principal papel fisiológico das lipases vegetais é o de clivar os triglicerídeos estocados na semente, para liberar os ácidos graxos e fornecer energia para o crescimento do embrião (SETH et al., 2014).

Dentre as fontes microbianas de lipases de interesse industrial e biotecnológico se destacam fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SHARMA et al., 2001). Quanto aos fungos filamentosos, os principais gêneros que produzem lipases de importância comercial são *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* e *Rhizomucor*. Dentre as leveduras, o gênero *Candida* é como principal produtor, porém, os gêneros *Rhodotorula*, *Yarrowia*, *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Williopsis* também são descritos na literatura como produtores de lipase. No caso das bactérias, os principais gêneros descritos são *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia* e *Acinetobacter* (TREICHEL et al., 2010).

Novas fontes microbianas com potencial lipolítico estão sendo identificadas pela exploração da biodiversidade e prospecção de linhagens produtoras de lipases nativas que apresentem propriedades catalíticas interessantes para aplicações industriais (CASTRO-OCHOA et al., 2005; GOLDBECK; FILHO, 2013). Contudo, uma abordagem que vem sendo explorada para possibilitar o uso industrial de enzimas como catalisadores é a super expressão dos genes de interesse. Este processo é considerado trivial, uma vez que muitas proteínas podem ser facilmente expressas e secretadas utilizando sistemas de expressão

comercialmente disponíveis (JAEGER; EGGERT, 2002). Em geral, as lipases bacterianas são expressas utilizando a bactéria *Escherichia coli* como sistema de expressão, enquanto lipases fúngicas utilizam as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* (KADEMI et al., 2003; SANDOVAL; 2012). A lipase de *Geobacillus thermoleovorans* Toshki foi expressa em *E. coli* com aumento de atividade de 4 a 5 vezes em relação à linhagem selvagem (ABDEL-FATTAH; GABALLA, 2008). A secreção de lipase de uma linhagem de *Bacillus subtilis* foi aumentada em 100 vezes após super expressão num sistema de *B. subtilis* modificado (MA et al., 2006). Este fator de 100 vezes de aumento também foi observado para a super expressão da lipase de *Rhizopus delemar* em *E. coli* (JOERGER; HAAS, 1993). A expressão heteróloga de *Ophiostoma piceae* em *P. pastoris* aumentou em 46 vezes a secreção de lipase (VAQUERO et al., 2015). Um aumento de 1,5 vezes na secreção de lipase de *Yarrowia lipolytica* foi atingido quando expressa em *S. cerevisiae* (DARVISHI; 2012).

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

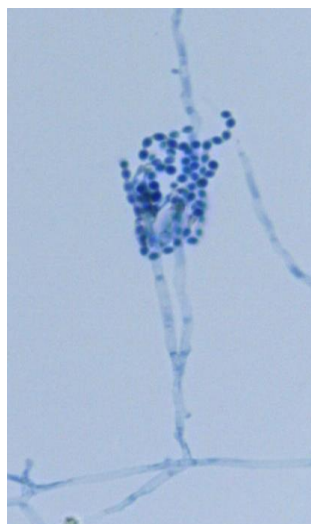
A linhagem de *Penicillium* sect. Gracilentia CBMAI 1583 utilizada neste estudo foi isolada de solo sob Mata Atlântica, da região conhecida como Banhado Grande, Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. A Estação Ecológica de Juréia-Itatins foi criada em 20 de janeiro de 1986, sendo a referida lei promulgada em 28 de abril de 1987. Seus 79.245 hectares se estendem pelos municípios de Iguape, Peruíbe, Miracatu e Itariri, delimitados ao norte pela Serra dos Itatins, ao sul pelo Maciço da Juréia, a oeste pelo Banhado Grande e a leste pelo Oceano Atlântico. A coleta foi realizada em uma área de mata secundária, que está em processo de recuperação devido ao severo desmatamento sofrido para o plantio de arroz, há cerca de 50 anos atrás (GARLIPP, 1995).

No trabalho de Garlipp (1995) esta linhagem foi identificada como *Penicillium janthinellum*. No entanto, estudos moleculares preliminares atualmente realizados, baseados nas sequências gênicas ITS 5 e β -tubulina, indicaram não se tratar desta espécie.

Na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/CPQBA - UNICAMP), Paulínia, São Paulo, Brasil, onde esta linhagem se encontra depositada (número de acesso 1583), não foi possível identificá-la em nível de espécie. Porém, estudos morfológicos e moleculares realizados neste instituto mostraram que essa espécie se insere na seção *Gracilentia*. A dificuldade na identificação deste fungo sugere que se trata de uma nova espécie, motivando ainda mais o interesse pela investigação de sua lipase.

Cultivada em meio sólido aveia-água, o micélio da linhagem em questão apresenta coloração branca até, aproximadamente, o terceiro dia de cultivo, quando começa a esporular, passando a apresentar coloração verde acinzentada após este período. A **Figura 5** mostra um conidióforo de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 com oito dias de idade, em imagem obtida através de microscopia óptica.

Figura 5 – Conidióforo de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 cultivado em meio sólido aveia-água por oito dias.



Coloração lactofenol; microscopia óptica (aumento 400 X). Fonte: elaborado pela autora.

Esta linhagem foi estudada quanto à produção de celulases e xilanasas, mostrando um potencial interessante para a produção dessas enzimas (RUEGGER; TAUKTORNISIELO, 2004), e foi selecionada como boa produtora de lipase em triagem prévia para esta atividade (ALMEIDA et al., 2013).

O estudo da produção de lipase por essa linhagem foi realizado por Turati (2012), trabalho no qual foram avaliadas as influências de diferentes meios de cultura, tempo de cultivo, fontes de carbono e sua concentração, fontes de nitrogênio, agitação, pH e temperatura de cultivo. Foram testados quatro meios de cultura, sendo o melhor resultado

verificado no meio proposto por Dheeman et al. (2011), com a maior produção observada após 72 h de cultivo. As melhores concentrações das fontes de nitrogênio (g.L^{-1}) e pH foram: bacto-peptona, 5,0; extrato de levedura, 1,0; nitrato de sódio (NaNO_3); pH 5,5. Treze fontes de carbono puras, dentre elas triacilgliceróis, ácidos graxos, carboidratos simples, alcoóis e ácidos orgânicos, e onze fontes de carbono complexas, como óleos vegetais e gorduras animais, foram também analisadas. Destas, 0,5 % (m/v) de azeite de oliva se apresentou como melhor indutor da produção de lipase. A temperatura de cultivo que possibilitou maior produção de lipase foi 28 °C e a agitação foi de 160 rpm. Após este estudo, a produção de lipase por este fungo foi aumentada em 3,25 vezes.

2.4 Purificação e caracterização de lipases microbianas

As estratégias de purificação das lipases envolvem, geralmente, métodos clássicos de purificação de proteínas, como precipitação com sulfato de amônio e cromatografias de exclusão molecular, troca iônica e interação hidrofóbica (SAXENA et al., 2003; TAN et al., 2014). Os trabalhos disponíveis na literatura empregam, em geral, numerosas etapas, resultando em baixos rendimentos. A purificação da lipase de *Aspergillus awamori* HB-03 através de precipitação com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) resultou em um fator de purificação de 10,6 e rendimento de 18,84% (XIA et al., 2011). A lipase de *Penicillium candidum* foi purificada 36,7 vezes, com rendimento de apenas 0,8 % após as etapas de precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografia de interação hidrofóbica com Octil-Sepharose e cromatografia de troca iônica com DEAE-Sepharose A-50 (RUIZ et al., 2001). A lipase de *Bacillus stearothermophilus* foi purificada após ultrafiltração, cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-200 e cromatografia de troca iônica com DEAE-celulose, alcançando um fator de purificação de 19,25 e um rendimento de 10,2 % (KAMBOUROVA et al., 2003).

Com o intuito de diminuir as etapas do processo e aumentar os rendimentos de purificação outras estratégias foram propostas, baseadas na característica peculiar das lipases de possuírem a tampa hidrofóbica recobrando o sítio ativo. A cromatografia de interação hidrofóbica em condições de baixa força iônica permite a adsorção seletiva de lipases, sendo uma estratégia para purificação, imobilização, ativação e estabilização dessas enzimas em apenas uma etapa (BASTISDA et al., 1998; CUNHA et al., 2009). A lipase de

Candida viswanathii foi purificada em uma única etapa com a resina Octil-Sepharose sob baixa força iônica (50 mM), com fator de purificação de 19,5 e rendimento de 70,8 %, além de ter originado derivado imobilizado com eficiência catalítica maior que da enzima solúvel (ALMEIDA et al., 2012). Outra estratégia que permite purificar lipases com base em sua tampa hidrofóbica foi reportada por Palomo et al. (2004). Estes autores propuseram a purificação via interação específica lipase-lipase, baseando-se na tendência da lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) em formar agregados biomoleculares. Esta enzima foi imobilizada covalentemente em glioxil-agarose na presença do detergente Triton X-100, o que permitiu a obtenção de moléculas com o centro ativo orientado para o meio reacional. Dessa maneira, o derivado da imobilização apresentou a capacidade de adsorver outras moléculas de lipases de PFL e, também, de outras fontes microbianas. As lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus oryzae* e *Rhizomucor miehei* foram purificadas através desta estratégia.

As lipases purificadas apresentadas na literatura foram caracterizadas em relação a diversas propriedades, como massa molecular, ponto isoelétrico, pH e temperatura ótimos de atividade, atividade e estabilidade em diversos solventes, íons, detergentes, pH e temperatura. Em geral, as lipases microbianas apresentam massa molecular de 11 a 60 kDa, pH ótimo em condições neutras a alcalinas, temperatura ótima em torno de 30 a 50 °C, são estáveis na presença de solventes, detergentes e sais e são termoestáveis. A **Tabela 1** apresenta estratégias cromatográficas utilizadas para a purificação de algumas lipases microbianas, bem como algumas das características destas enzimas purificadas. Exemplos de bactérias, leveduras e fungos filamentosos são apresentados, com ênfase para a purificação de lipases de fungos do gênero *Penicillium*.

Tabela 1 - Purificação e caracterização bioquímica de diferentes lipases microbianas.

Micro-organismo	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Schizophyllum commune</i> ISTL04	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i> MC 7	<i>Staphylococcus aureas</i>
Estratégia de purificação	Precipitação com sulfato de amônio (30%); Sulfopropil-Sepharose; Sephadex G-75; Sulfopropil-Sepharose	Precipitação com sulfato de amônia (70%); Superdex™ 200	Precipitação com sulfato de amônio; DEAE-Sephadex; Sephadex G-200; Sephadex G-100	Ultrafiltração; Sephadex G-200; DEAE-Sepharose	Ultrafiltração; Fenil-Sepharose; Superose 12
Fator de purificação e rendimento	1260 e 22%	35,76 e 36,57%	7,76 e 18,06%	19,25 e 10,2%	6,76 e 20%
Massa molecular (kDa)	32	60	32	62,5	49
pH e temperatura ótimos	7,5	11 e 60°C	7 e 40°C	7,5-9 e 75-80 °C	8 e 37°C
Estabilidade em íons metálicos	Atividade residual <90% para todos os íons testados.	Ca ²⁺ , Mn ⁺ , Mg ²⁺	Ca ²⁺ , Ba ²⁺ e Mg ²⁺	Na ⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	Fe ²⁺ , Hg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , Cu ²⁺
Estabilidade em solventes orgânicos	Hexanol, dodecanol, decanol, hexano, heptano, isoctano e ciclohexano	DMSO, tolueno, clorofórmio, hexano e heptano	NA	NA	Acetonitrila e tolueno
Estabilidade em detergentes e/ou estabilizantes	NA	Tween 80	NA	Sorbitol	NA
Substrato preferencial	Ácidos graxos cadeia saturada (C8-C18)	NA	NA	Tributirina (C4) e (C16) pNPP	C10 (pNPC)
Parâmetros cinéticos	NA	NA	NA	K _m : 0,33 mM; V _{max} : 188 μMmin ⁻¹ mg ⁻¹ - pNPP	K _m : 0,58 mM; k _{cat} : 4642 μMmin ⁻¹ - pNPC
Referência	HIOL et al., 2000	SINGH et al., 2014	GOPINATH et al., 2003	KAMBOUROVA et al., 2003	SARKAR et al., 2012

NA – não avaliado.

Tabela 1 – Continuação.

Micro-organismo	<i>Penicillium abeanum</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Penicillium expansum</i>
Estratégia de purificação	Ultrafiltração; DEAE-Sephadex; Sephadex G-100; Éter Toyopearl 650M	Precipitação com sulfato de amônio (30%); DEAE-Toyopearl 650M; Fenil-Toyopearl 650M; Toyopearl HW-60	Precipitação com sulfato de amônio (75%); Fenil-Sepharose; Ultrogel AcA-54; hidroxiapatita	Precipitação com sulfato de amônio (65%); Sephadex G-75; DEAE-Sephadex; Sephadex G-75	Ultrafiltração; precipitação com sulfato de amônio (50%); Fenil-Sepharose
Fator de purificação e rendimento	205 e 12%	17 e 32%	788 e 20%	590 e 30%	219 e 5%
Massa molecular (kDa)	28	25	56	37	25
pH e temperatura ótimos	7-8 e 25-30°C	6-7 e 35°C	5 e 37°C	7 e 40°C	9 e 45°C
Estabilidade em íons metálicos	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Co ⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Sr ²⁺ , Mo ²⁺ , Cd ²⁺ , Sn ²⁺ , Ba ²⁺	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Cu ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Atividade residual <80% para todos os íons testados, exceto Zn ²⁺ .	NA	Atividade residual <80% para todos os íons testados, exceto Hg ²⁺ .
Estabilidade em solventes orgânicos	NA	NA	Propanol, tolueno, benzeno, hexano, heptano, isoctano	NA	Instável em propanol, etanol e acetona
Estabilidade em detergentes e/ou estabilizantes	NA	NA	NA	NA	Tween 20, Lubrol PX, taurocolato, octilglucosideo, Brij 30,
Substrato preferencial	Ácido graxo C8	Ácidos graxos C4 e C6	NA	Monolaurina (C12)	Trioleína
Parâmetros cinéticos	NA	NA	NA	Km: 0,1 mM; V _{max} : 1000U mg ⁻¹ - dicaprilina	NA
Referência	SUGIHARA et al., 1996	MASE et al., 1995	SZTAJER et al., 1992	CHAHINIAN et al., 2000	STOCKLEIN et al., 1993

NA – não avaliado.

Tabela 1 – Continuação.

Micro-organismo	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i> HN2.3	<i>Cryptococcus sp. S-2 were</i>	<i>Pichia lynferdii</i> Y-7723	<i>Mortierella alliacea</i> YN-15,
Estratégia de purificação	Precipitação com acetona; Sepharose Q; Butil Sepharose	Precipitação com sulfato de amônio; Sephadex G-75; DEAE-Sepharose	Ultrafiltração; Sulfopropil-5PW	Sephacryl S-200; DEAE-Sepharose	Precipitação com acetona; DEAE-Sepharose; Superdex 200
Fator de purificação e rendimento	26,5 e 23%	3,4 e 4,8%	17,1 e 11,4%	33,10 e 0,31%	6,2 e 4%
Massa molecular (kDa)	38	63,5	22	NA	11
pH e temperatura ótimos	8 e 40°C	8,5 e 35°C	7 e 37°C	8 e 15°C	9 e 50°C
Estabilidade em íons metálicos	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , K ⁺ , Mn ²⁺	Fe ³⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ca ²⁺ , Li ⁺ , Cu ⁺ , Mg ²⁺ , Ba ⁺	NA	Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ⁺ , Co ²⁺ , Na ⁺ , Cu ²⁺ e Al ³⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺
Estabilidade em solventes orgânicos	DMSO, acetona, metanol, etanol, isopropanol	NA	DMSO, dietil éster, hexano, DMF e acetona	NA	NA
Estabilidade em detergentes e/ou estabilizantes	Tween 80; Triton X-100, Span 65; Span 85; DTT e β-mercaptanol	NA	NA	NA	NA
Substrato preferencial	Óleo de Cártamo	Óleo de amendoim	Tricaprilina (C8)	NA	Monoacilglicerol
Parâmetros cinéticos	NA	K _m : 0,608 mM; V _{máx} : 0,039 mMmin ⁻¹ - pNPL	NA	NA	NA
Referência	YU et al., 2007	LIU et al., 2008	KAMINI et al., 2000	BAE et al., 2014	JERMSUNTIEA et al., 2011

NA – não avaliado

2.5 Aplicações industriais das lipases

Em função de sua diversidade catalítica, especificidade e seletividade, as lipases são amplamente utilizadas em diversos setores da indústria. Juntamente com outras enzimas hidrolíticas, representam 75 % das formulações enzimáticas comercializadas, destacando-se por atuarem também em sínteses orgânicas (GUPTA et al., 2015). Desde 1979, essas enzimas são utilizadas industrialmente, sendo aplicadas em alimentos, detergentes, cosméticos, couro, biocombustíveis e outras áreas (ANOBOM et al., 2014; HASAN et al., 2006; SHARMA et al., 2001).

Na indústria de alimentos, as lipases são utilizadas, principalmente, para melhorar as propriedades funcionais e nutricionais dos alimentos, com o objetivo de melhorar os benefícios para a saúde e a apreciação do produto pelo consumidor (KIM et al., 2008). Um exemplo de enriquecimento funcional e nutricional de um alimento é a hidrólise de óleos e gorduras para a obtenção de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3, 6 e seus variantes. A hidrólise de óleo de peixe, por exemplo, aumenta o teor dos ácidos graxos livres eicosapentaenoico (EPA; 20:5 ω 3) e docosahexaenoico (DHA; 22:6 ω 3) (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011; MORENO-PÉREZ et al., 2014). O primeiro auxilia na prevenção de doenças cardiovasculares em adultos, como arteriosclerose, trombose e arritmia; enquanto o segundo é requerido pelo cérebro nos primeiros estágios de vida, sendo essencial para otimizar as funções neurais e auxiliar na aprendizagem e na memória. Fernandez-Lorente et al. (2011) imobilizaram em diferentes suportes seis lipases microbianas disponíveis comercialmente e utilizaram os biocatalisadores na hidrólise do óleo de sardinha. Todos os derivados foram capazes de hidrolisar seletivamente este óleo, sendo liberado preferencialmente EPA. Pizarro et al. (2012) também realizaram a hidrólise seletiva do óleo de sardinha, utilizando lipase imobilizada de *Candida cylindracea*. Estes autores verificaram a liberação de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, mostrando que as lipases podem ser utilizadas para o enriquecimento de óleos comestíveis com ácidos graxos de interesse nutricional.

As lipases são utilizadas também na síntese de ésteres de cadeia curta de importância para a indústria de aromas, através da esterificação de ácidos graxos e álcoois. Alguns ésteres aromáticos sintetizados são: butirato de etila, aroma de abacaxi e manga (GROSSO et al., 2013); acetato de butila, aroma de banana e maçã (MARTINS et al.,

2011); butirato de metila, aroma de abacaxi, morango e maçã (GARLAPATI; BANERJEE, 2013); e butirato de butila, aroma de abacaxi (SILVA et al., 2014).

Ainda na indústria de alimentos, as lipases também são utilizadas para sintetizar lipídios estruturados. Estes lipídios são triacilgliceróis modificados em relação à composição de ácidos graxos ou à posição destes no glicerol, apresentando propriedades nutricionais e/ou funcionais melhoradas (OSBORN; AKOH, 2002). Alguns lipídios estruturados sintetizados incluem manteiga de cacau interesterificada com óleos de menor valor comercial, a fim de baratear a produção; e síntese de triacilgliceróis com valores calóricos reduzidos (GUPTA et al., 2003).

Outro setor de aplicação das lipases é na produção de biodiesel, obtido através da transesterificação de triacilglicerídeos ou esterificação de ácidos graxos livres com álcoois de cadeia curta (metanol e etanol). O biodiesel é uma alternativa energética renovável, sendo que a catálise enzimática reduz a produção de óxidos de enxofre e o gasto de energia na produção, facilita a recuperação do glicerol formado como subproduto e evita o uso de grandes quantidades de reagentes químicos (JAEGER; EGGERT, 2002; BAJAJ et al., 2010). Resultados promissores são relatados na literatura, como a transesterificação entre óleo de canola e metanol catalisada pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em poliuretano ativado com glutaraldeído (conversão de 97 % em 24 h) (ROYON et al., 2007) e a transesterificação entre óleo de palma e etanol catalisada pela lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em polímeros comerciais ativados com epicloridrina (conversão de 98 % em 24 h) (MOREIRA et al., 2007). No entanto, um gargalo para utilização de lipases em escala industrial é o alto custo do biocatalisador apropriado (JAEGER; EGGERT, 2002).

A indústria de detergentes consiste na principal aplicação de lipases. Juntamente com proteases e celulasas, essas enzimas são empregadas na remoção de manchas de óleos e gorduras, devendo apresentar baixa especificidade por substratos e alta atividade nas temperaturas amenas de lavagem e em condições alcalinas (CASTRO et al., 2004; HASAN et al., 2010).

Na indústria de couros, essas enzimas são aplicadas em substituição aos solventes químicos utilizados para remoção de lipídios, gerando um produto de melhor qualidade em relação à uniformidade da coloração e limpeza (HASAN et al., 2006).

Desde o início de 1990, as lipases são utilizadas em larga escala pela indústria de papel e celulose, atuando na remoção dos componentes hidrofóbicos da madeira presentes na pasta de celulose (HASAN et al., 2006). A indústria Nippon Paper (Japão) desenvolveu um método que utiliza a lipase de *Candida rugosa* para hidrolisar até 90 % das ceras e glicerídeos presentes na madeira (SHARMA et al., 2001).

As indústrias farmacêutica e agroquímica tem grande interesse no uso de lipases, devido a sua elevada estereoseletividade. As lipases são capazes de distinguir isômeros R e S, sendo efetivas na resolução de misturas racêmicas. Esta característica é importante para a síntese de moléculas bioativas, uma vez que a quiralidade é um fator chave na eficácia de muitas drogas e pesticidas. Em geral, apenas um dos isômeros apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (ANOBOM et al., 2014; FONSECA et al., 2015; KAPOOR; GUPTA, 2012). A obtenção do precursor de um fármaco prescrito para o tratamento de hipertensão arterial (Diltiazem) é realizada através da resolução racêmica do éster metil-3-(4-metoxifenilglicidato) pela lipase de *Serratia marcescens* (MATSUMAE et al., 1993). A síntese de outro fármaco, indicado para o tratamento da doença de Parkinson (Azilect®), através do uso da lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em resina aniônica foi demonstrada por Fonseca et al. (2015). Esses autores demonstraram que a síntese do composto (S)-indanol ocorre com elevada seletividade em apenas 15 minutos de reação a 35 °C na presença de hexano, com reuso de 10 ciclos sem perdas acentuadas de atividade e seletividade.

As lipases podem ainda ser aplicadas num contexto ambiental de biorremediação. Os resíduos de indústrias de laticínios, matadouros, processamento de peixes e de biodiesel contêm elevadas concentrações de óleos e gorduras de difícil degradação. O descarte direto desses resíduos gera problemas ambientais, como a formação de agregados lipídicos que dificultam a transferência de nutrientes solúveis aos micro-organismos e, conseqüentemente, diminuem a eficiência da fermentação, além de contribuir para a formação de espumas e mau odor (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; LI; ZONG; 2010). Neste sentido, as lipases são eficientemente empregadas no pré-tratamento destes resíduos, reduzindo o diâmetro das partículas gordurosas e aumentando a sua área de superfície, o que favorece a assimilação do material orgânico pelo consórcio microbiano (CAMMAROTA; FREIRE, 2006). Valladão et al. (2007) avaliaram a influência da pré-

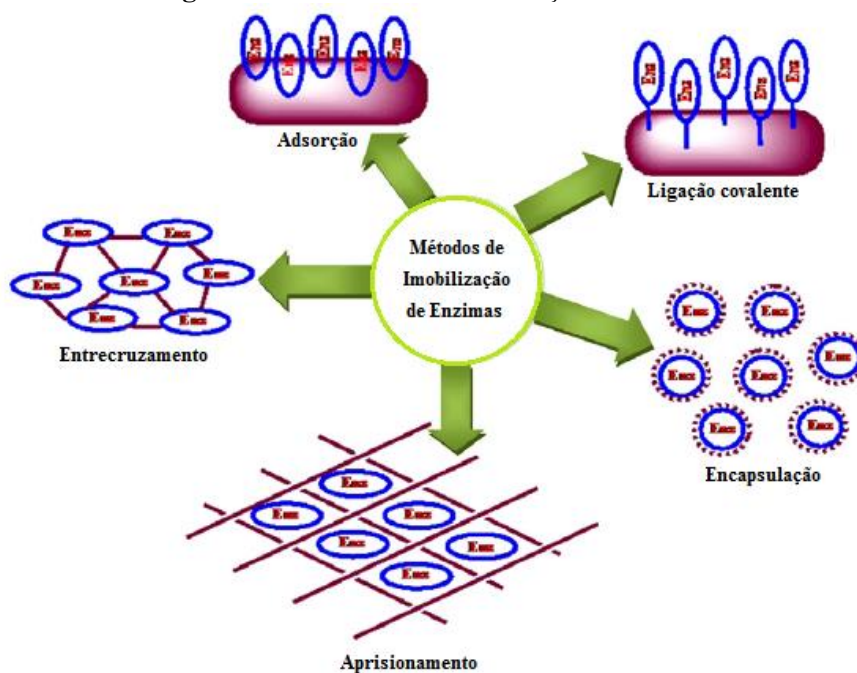
hidrólise do efluente de abatedouros de frangos com lipase de *Penicillium restrictum*. Estes autores observaram que o pré-tratamento com 0,1 % (m/v) de lipase diminuiu a demanda química de oxigênio de 85 para 53 % e a produção de biogás de 175 para 37 mL em relação ao controle sem pré-tratamento. Em outro estudo, foi verificado que a porcentagem de gordura aderida às tubulações do esgoto diminuiu de 19,9 para 8,6 % com a pré-hidrólise com lipase de uma espécie de *Penicillium* sp (VALLADÃO et al., 2009).

2.6 Imobilização de lipases microbianas

O uso de enzimas solúveis em processos industriais é, muitas vezes, dispendioso e economicamente inviável, devido ao seu descarte após o uso, baixa estabilidade e eficiência nas diversas condições dos processos. A imobilização de enzimas é uma alternativa a esses problemas, uma vez que melhora propriedades catalíticas das enzimas, a estabilidade e é passível de reuso, além de permitir que apenas os produtos sejam retirados em processos de múltiplas etapas (BRADY; JORDAAN, 2009).

Imobilização é um termo empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator ou de um sistema analítico. No caso das enzimas, a imobilização consiste no confinamento da proteína em um suporte insolúvel, insolubilizando-a (VILLENEUVE et al., 2000; MATEO et al., 2007). Estratégias eficientes de imobilização vêm sendo desenvolvidas, sendo que as técnicas mais utilizadas incluem: adsorção física ou iônica em suporte sólido, ligação covalente a um suporte sólido, encapsulação física dentro de membranas ou matrizes poliméricas e ligações cruzadas intermoleculares (**Figura 6**) (OZTURK, 2001).

Figura 6 – Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptado de ASGHER et al., 2014.

A imobilização por encapsulação consiste no confinamento da enzima no interior de polímeros insolúveis, através da co-polimerização de monômeros da matriz e da enzima. Neste sistema, as moléculas proteicas não são capazes de difundir através dos poros da matriz, enquanto pequenas moléculas, como substratos e produtos, podem se difundir (DALLA-VECCHIA et al., 2004). Esta técnica permite a imobilização da enzima sem interação química com o polímero, no entanto problemas difusionais podem ocorrer (VILLENEUVE et al., 2000). A imobilização por adsorção é uma técnica simples e uma das mais utilizadas. A enzima é imobilizada em um suporte sólido através de ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e iônicas e interações hidrofóbicas. O tipo de adsorção (física ou iônica) depende da funcionalização do suporte, das condições do meio de imobilização e de características da proteína alvo (VILLENEUVE et al., 2000). A imobilização por ligação covalente se baseia na formação de ligações entre o suporte e alguns radicais funcionais dos resíduos de aminoácidos presentes na superfície da enzima (principalmente grupos aminos: α -NH₂ da cadeia terminal, ϵ -NH₂ da lisina e/ou NH₂ proveniente de aminação química) (MURTY et al., 2002.) Os derivados de imobilizações covalentes são, em geral, mais estáveis que as enzimas livres e que derivados de outros métodos de imobilizações. No entanto, a

rigidificação da estrutura terciária da proteína pode levar a redução da atividade enzimática e até a perda da mesma (GUISAN, 1988; BLANCO et al., 2007; BRADY; JORDAAN, 2009).

Os suportes são classificados em: naturais orgânicos, como celulose, agarose, dextrana e quitosana; naturais inorgânicos, como pedra pome e sílica; sintéticos orgânicos, como poliacrilatos, poliamidas e polivinil; e sintéticos inorgânicos, como cerâmica, vidro e suportes magnéticos (GUISAN, 2006). As principais características a serem observadas na seleção do suporte são área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência ao ataque microbiano, resistência mecânica e química e custo, entre outras (DALLA-VECCHIA et al., 2004; MATEO et al., 2007; MENDES et al., 2011).

Um tipo de adsorção especialmente interessante no caso de lipases é a adsorção hidrofóbica, uma vez que essas enzimas são ativadas na presença de superfícies hidrofóbicas através do mecanismo de ativação interfacial (PIZARRO et al., 2012). Neste tipo de imobilização a forma aberta da enzima é estabilizada por interações entre as regiões hidrofóbicas da estrutura protéica, ou seja, a face interna da tampa e os resíduos de aminoácidos na cavidade do centro catalítico, e a superfície hidrofóbica do suporte (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008). A adsorção hidrofóbica de lipases em baixa força iônica permite a hiperativação da atividade enzimática, adsorção altamente seletiva, podendo ser uma estratégia para purificação destas enzimas, promove mudanças na seletividade catalítica e é forte o suficiente para imobilizar a enzima no suporte, mas é reversível, o que permite recuperação e reuso do suporte após inativação da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Apesar de existirem diversas técnicas e suportes de imobilização, não existe um método universal válido para todas as enzimas em todos os casos. A escolha destes parâmetros deve ser realizada levando-se em conta a natureza da proteína a ser imobilizada, o tipo e as condições da reação catalisada e o tipo de reator que será utilizado (ARROYO, 1998). Além disso, não é possível prever com exatidão o comportamento da enzima e as características dos derivados formados com cada tipo e suporte de imobilização, sendo que as condições ideais dos processos devem ser determinadas empiricamente (ARROYO,

1998). A **Tabela 2**, adaptada de Souza (2015), reúne aplicações biotecnológicas de algumas lipases comerciais imobilizadas por diferentes técnicas e em diferentes suportes.

Tabela 2 – Aplicações biotecnológicas de lipases comerciais imobilizadas por diferentes técnicas e em diferentes suportes.

Lipase	Método	Suporte	Reuso	Aplicação	Referência
<i>Candida antarctica</i> (CALB), <i>Thermomyces lanuginosa</i> (TLL), <i>Rhizomucor miehei</i> (RML)	Adsorção (interação hidrofóbica)	Octil-Sepharose	NA	Hidrólise de óleo de peixe	FERNANDEZ-LORENTE et al., 2010
CALB	Adsorção (interação hidrofóbica)	Polipropileno Accurel (MP1000b)	5 ciclos (atividade residual de 75%)	Esterificação e amidação de ácidos graxos.	TUFVESSON et al., 2011
<i>Candida rugosa</i>	Ligação covalente	Óxido de nióbio hidratado	10 ciclos (atividade residual de 75%)	Produção de biodiesel	MIRANDA et al., 2011
<i>C. antarctica</i> (Novozym 435)	Adsorção (Interação hidrofóbica)	Resina acrílica	11 ciclos (atividade residual próxima a 90%)	Produção de cafeato de metila.	WANG et al., 2015
CALB, TLL e RML	Adsorção (interações hidrofóbica e iônica)	Duolite A568, Lewatit VP OC 1600 e Octadecil Sepabeads®	NA	Etanólise do óleo de sardinha.	MORENO-PÉREZ et al., 2014
CALB	Adsorção (interações hidrofóbica e iônica) e ligação covalente	Duolite, Lewatit VP OC 1600 e Lewatit Gx 105	10 ciclos (atividade sintética similar após 3 h de reação)	Síntese de antioxidante	MORENO-PÉREZ et al., 2013

NA – não avaliado. Fonte: Adaptada de SOUZA (2015).

Capítulo 1

PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DE LIPASE PRODUZIDA POR *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583

RESUMO

As lipases (triacilglicerol acil hidrolases, E.C. 3.1.1.3) catalisam a hidrólise das ligações éster de triacilgliceróis, operando na interface água/óleo. Estas são enzimas ubíquas, porém as de origem microbiana têm se destacado no cenário industrial atual devido ao seu amplo espectro de aplicação. Dessa maneira, a prospecção de novas fontes de lipases com propriedades distintas é uma linha de pesquisa importante. Dentre os micro-organismos, os fungos vêm sendo explorados para a produção de enzimas por secretarem grandes quantidades de proteínas no meio extracelular que não são nocivas à saúde humana, em sua grande maioria. Este trabalho se insere neste contexto, uma vez que visa purificar e caracterizar as principais propriedades bioquímicas da lipase produzida pelo fungo filamentoso *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583, isolado de solo de Mata Atlântica e ainda não estudado em relação a essa enzima. O pH e a temperatura ótimos de atividade lipásica foram 4,0 e 70 °C, respectivamente, tanto para a enzima presente no filtrado de cultura quanto para a enzima purificada. As energias de ativação da reação de hidrólise do p-nitrofenil palmitato catalisada pela lipase presente no filtrado de cultura e pela lipase purificada foram 27,01 e 8,77 kJ.mol⁻¹, respectivamente. A enzima do filtrado se mostrou mais estável em relação à temperatura (T_(1/2) de 1,5 h, 6,3 e 2,3 min a 50, 60 e 70 °C, respectivamente) e menos estável em relação ao pH (estável apenas entre os pH 5,0 e 7,0) que a enzima purificada. A enzima purificada apresentou T_(1/2) de 8,5 min, 33,6 e 15,4 s nas mesmas temperaturas e estabilidade em pH de 2,0 a 8,5. Em relação à estabilidade na presença de surfactantes, os detergentes aniônicos desestabilizaram a estrutura proteica, com conseqüente perda de atividade, enquanto detergentes não iônicos a 1 % (m/v) ativaram a enzima. A lipase foi purificada em uma única etapa, através de cromatografia de interação hidrofóbica com baixa força iônica utilizando a resina fenil Sepharose, como evidenciado por SDS-PAGE. Com esta estratégia, foi possível recuperar 80,8 % da atividade inicial e atingir um fator de purificação de 516,1. A massa molecular da enzima foi estimada em 52,9 kDa por SDS-PAGE e em 85,3 kDa por cromatografia de exclusão molecular, o que sugere a formação de agregados diméricos no estado nativo. A 10 mM, a lipase purificada foi inibida por PMSF, SDS, Hg²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ e Zn²⁺, e estimulada por Tween 20, Tween 80, Mg²⁺, Na⁺, NH₄⁺, Mn²⁺ e Pb²⁺. A enzima purificada se mostrou estável em diversos solventes a 10 %, sendo sensível apenas a n-butanol e xilol, com 37,9 e 36,3 % de atividade residual, respectivamente. A lipase foi capaz de hidrolisar ésteres de p-nitrofenila com cadeias carbônicas saturadas de 10 a 18 carbonos, com máxima atividade hidrolítica sobre o substrato p-nitrofenil decanoato (C10:0). A cinética enzimática de hidrólise do p-nitrofenil palmitato seguiu o modelo proposto por Michaelis-Menten, tanto na presença quanto na ausência de Triton X-100. As características verificadas da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 são favoráveis para aplicações industriais desta enzima em processos que atuem em pH ácidos, elevadas temperaturas e que contenham diferentes lipídios, como tratamentos de efluentes ou processos diversos na indústria de alimentos, bem como em síntese orgânica na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: Triacilglicerol acil hidrolase. Fungo filamentoso. Purificação de enzima. Caracterização de enzima.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolases, EC 3.1.1.3) are ubiquitous enzymes. However microbial enzymes stand out on the current industrial scenario, due to their wide spectrum of application. In this sense, prospection of new sources of lipases with distinct characteristics is an important research field. Among microorganisms, fungi are being explored for enzyme production, because they secrete high amounts of proteins to extracellular medium that are generally regarded as safe for human health. This work is inserted in this context once it aims to purify and to characterize the main biochemical properties of lipase produced by the filamentous fungus *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583, isolated from soil under Atlantic Rainforest and yet not studied in respect to this enzyme. Optima pH and temperature of activity were 4.0 and 70 °C, respectively, for both crude and purified lipase. Activation energies of hydrolysis of pNPP catalyzed by crude and purified lipase were 27.01 and 8.77 KJ.mol⁻¹, respectively. Crude lipase was more stable to temperature ($T_{(1/2)}$ of 1.5 h, 6.3 and 2.3 min at 50, 60 and 70 °C, respectively) and less stable to pH (stable only at pH 5.0 to 7.0), while purified lipase showed the opposite behavior ($T_{(1/2)}$ of 8.5 min, 33.6 and 15.4 s at the same temperatures; and stable at pH 2.0 to 8.5). Regarding the stability in presence of surfactants, anionic detergents destabilized the protein structure with consequent loss of activity, while nonionic detergents at 1 % (w/v) activated the enzyme. Lipase was purified to homogeneity by one step, through a hydrophobic interaction chromatography at low ionic strength using the Phenyl Sepharose resin, as revealed by SDS-PAGE. By this strategy it was possible to recover 80.8 % of initial activity and achieve a purification factor of 516.1. Enzyme molecular mass was estimated to be 52.9 kDa by SDS-PAGE and 85.3 kDa by size exclusion chromatography, suggesting the formation of bimolecular aggregates in the native form. At 10 mM, purified lipase was inhibited by PMSF, SDS, Hg²⁺, Cu²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ and Zn²⁺, and stimulated by Tween 20, Tween 80, Mg²⁺, Na⁺, NH₃⁺, Mn²⁺ and Pb²⁺. Purified lipase was stable at many different organic solvents, but was sensitive to n-butanol and xylol, with residual activities of 37.9 and 36.3 % after one hour of incubation at 25 °C, respectively. The enzyme was capable of hydrolyzing p-nitrophenyl esters with saturated carbon chains of 10 to 18 carbons, displaying maximal hydrolytic activity towards p-nitrophenyl decanoate (C10:0). Enzyme kinetics for the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate followed the model proposed by Michaelis-Menten, both in the presence and absence of Triton X-100. The characteristics of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase are favorable for industrial applications of this enzyme in processes acting on acid pH, high temperature and containing various lipids, such as wastewater treatment or processes in the food industry.

Keywords: Triacylglycerol acyl hydrolases. Filamentous fungi. Enzyme purification. Enzyme characterization.

1 INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acil-hidrolases, E.C. 3.1.1.3) constituem uma importante classe de enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis, formando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos livres. Seus substratos naturais são triacilgliceróis de cadeia longa, de baixa solubilidade em água, o que confere às lipases a característica de catálise em uma interface óleo/água (GUPTA et al., 2003).

Estas enzimas são ubíquas, sendo que as lipases microbianas estão se destacando no cenário industrial atual devido ao seu grande espectro de aplicação, o qual está relacionado às suas diversas funções. Além de hidrolisar triacilgliceróis de cadeia longa, as lipases são capazes de catalisar a reação inversa, isto é, podem esterificar ácidos graxos e glicerol formando triacilgliceróis, bem como atuar em reações de transesterificação, alcoólise, lactonização, entre outras, em meios orgânicos com restrição de água (GOSH et al., 1996; REETZ, 2002; PAQUES; MACEDO, 2006).

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

A aplicação dessas enzimas de origem microbiana é realizada, por vezes, com o extrato bruto ou parcialmente purificado, como no caso do uso em detergentes. Desta maneira, o tempo necessário para ação da enzima é prolongado e a enantioselectividade é reduzida devido à presença de contaminantes, além de possíveis agentes tóxicos estarem presentes (CUNHA et al., 2009). Porém, a maioria das aplicações industriais das lipases

requer preparações purificadas, as quais asseguram maior eficiência catalítica e diminuem o risco de seu uso (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012). A purificação das lipases produzidas por micro-organismos ainda permite estudos mais detalhados quanto às suas características bioquímicas, suas sequências de aminoácidos e suas estruturas tridimensionais, gerando informações importantes acerca das relações entre estrutura e função dessas enzimas nas diferentes reações que catalisam (SAXENA et al., 2003). No entanto, as estratégias de purificação das lipases envolvem, geralmente, numerosas etapas e demandam períodos prolongados de tempo, resultando em baixo rendimento e encarecendo o produto final (CUNHA et al., 2009; MHETRAS et al., 2009; SAXENA et al., 2003). Algumas estratégias são capazes de purificar algumas lipases em apenas uma etapa, como a cromatografia de interação hidrofóbica com baixa força iônica. Este tipo de cromatografia tem sido utilizado para a purificação de lipases por apresentar baixo custo, demandar menos tempo e recuperar porcentagens elevadas da enzima, além de se constituir, algumas vezes, em uma estratégia para imobilização e hiperativação de lipases por adsorção (CUNHA et al., 2009).

A ampla gama de aplicação das lipases microbianas, a qual gera grande demanda industrial, motiva a busca por novas fontes de lipases com características distintas, como lipases estáveis em diferentes condições físicas e químicas, tornando necessário assim o isolamento e seleção de novos micro-organismos produtores, bem como estudos sobre otimização de sua produção, purificação, imobilização, caracterização e aplicação (TREICHEL et al., 2010).

O presente trabalho insere-se neste contexto, pois visa estudar as propriedades bioquímicas da lipase produzida por uma linhagem de *Penicillium*, bem como purificar e caracterizar esta enzima, conhecimentos importantes para futuras aplicações industriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais do presente trabalho foram: caracterizar parcialmente uma lipase extracelular produzida pelo fungo filamentosso *Penicillium* sect. *Gracilentia* J39 presente no extrato bruto de fermentação submersa, purificar esta enzima, e caracterizar a enzima purificada livre quanto às suas principais propriedades bioquímicas, visando futuras aplicações biotecnológicas.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o filtrado de cultura quanto à atividade ótima de catálise e à estabilidade da lipase em diferentes condições de pH, temperatura e na presença de surfactantes;
- Purificar a lipase extracelular presente no filtrado de cultura;
- Caracterizar a enzima livre purificada quanto às seguintes propriedades: massa molecular, atividade ótima de catálise e estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura; efeito de substâncias e íons metálicos sobre a atividade enzimática; efeito de solventes orgânicos sobre a estabilidade; especificidade por diferentes substratos sintéticos; e determinar seus parâmetros cinéticos sobre o substrato p-nitrofenil palmitato (pNPP).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos descritos neste capítulo foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Micro-organismos, do Departamento de Bioquímica e Microbiologia – Instituto de Biociências UNESP – Rio Claro/SP, sob orientação da Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona.

3.1 Linhagem: preservação, manutenção e cultivo

Todos os meios e materiais utilizados na preservação, manutenção e cultivo do micro-organismo foram autoclavados a, aproximadamente, 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

A linhagem de *Penicillium* utilizada neste estudo se encontra preservada por dois métodos. No laboratório de Bioquímica de Micro-organismos da UNESP de Rio Claro, discos de 1 cm de diâmetro contendo o fungo esporulado em meio sólido aveia-ágar foram preservados em água destilada autoclavada, a 4 °C (método de Castellani). Além deste método, a linhagem foi depositada na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/CPQBA - UNICAMP), Paulínia, São Paulo, Brasil, sob o número de acesso 1583, onde é preservada também pelo método de ultracongelamento a -80 °C.

A manutenção desta linhagem foi realizada em tubos de ensaio contendo o meio sólido aveia-ágar inclinado (em g L⁻¹: aveia, 40 g; ágar, 15 g), a partir de repiques incubados a 28 °C por cinco dias. Após este período, ela foi utilizada ou armazenada a 4°C.

Para o cultivo em meio líquido, conídios de cinco dias de idade foram suspensos em água destilada autoclavada, sendo a concentração ajustada entre 2 e 3 x 10⁷ conídios/mL a partir de contagem em Câmara de Neubauer. Um mililitro dessa suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL do meio de cultura. Os meios inoculados foram incubados a 28 °C por três dias, com agitação de 160 rpm. O meio de cultivo utilizado foi o proposto por Dheeman et al. (2011), modificado como segue: (g/L) bacto-peptona, 5,0; extrato de levedura, 1,0; nitrato de sódio (NaNO₃), 0,5; cloreto de potássio (KCl), 0,5; sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄·7H₂O), 0,5; fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄), 2,0; e azeite de oliva, 5,0; pH 5,5.

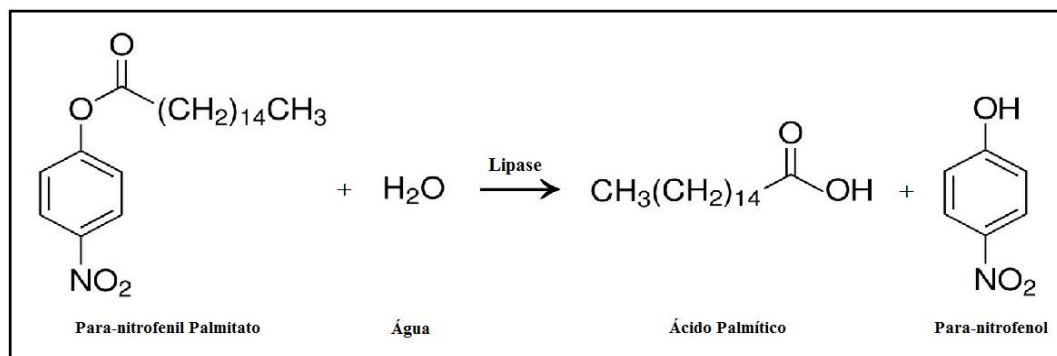
3.2 Obtenção do filtrado de cultura

Após a incubação, as culturas foram filtradas à vácuo, sendo o filtrado utilizado para caracterização parcial da enzima bruta e sua purificação. O filtrado foi armazenado em freezer, congelado a, aproximadamente, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade lipase foi quantificada empregando uma modificação do método proposto por Yang et al. (2002), utilizando-se o substrato sintético p-nitrofenil palmitato (pNPP). A hidrólise do pNPP foi determinada após 1 e 2 minutos de reação, em temperatura controlada, acompanhando-se a liberação do ânion p-nitrofenolato (pNP) (**figura 1**). O meio reacional utilizado continha 3,8 mg de pNPP solubilizado em 0,5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e, então, diluído a 0,5 mM com tampão adequado, contendo 0,5% de TritonX-100 (TX-100). A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de amostra, diluída convenientemente, a 900 μL de meio reacional. A reação foi interrompida pela imersão em banho-maria a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto, seguida pela adição de 1,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio decahidratado. O branco da reação correspondeu ao mesmo meio reacional descrito acima, adicionado de 100 μL de tampão ao invés de amostra. O pNP liberado foi determinado pela leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de pNP por minuto de reação. Nas condições do ensaio, o valor da absorvidade molar do pNP (ϵ) foi de $18033\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, calculado a partir da curva de calibração. Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicatas.

Figura 1 – Hidrólise do substrato sintético p-nitrofenil palmitato catalisada por lipase.



Fonte: elaborado pela autora.

3.4 Determinação de proteínas

A determinação do teor de proteínas totais das amostras foi realizada pelo método do ácido bicinonínico (BCA), de acordo com as instruções do fabricante (PIERCE™ Thermoscientific). Uma solução de 2 mg.mL⁻¹ da proteína soro albumina bovina foi utilizada como padrão.

3.5 Caracterização bioquímica parcial da lipase presente no filtrado de cultura

3.5.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

A influência do pH sobre a atividade lipase foi avaliada realizando ensaios enzimáticos em meio reacional preparado com diferentes tampões, utilizando intervalos de meia unidade de pH, sendo: tampão glicina-HCl 0,1 M para a faixa de pH de 2,0 a 3,0; tampão McIlvaine para pH de 3,0 a 7,5; e tampão Tris-HCl 0,5 M para pH de 7,5 a 8,5. A atividade foi determinada a 37 °C.

A temperatura ótima de atividade foi determinada através da quantificação da atividade enzimática nas temperaturas de 40 a 80 °C, com intervalos de 5 °C, no pH ótimo anteriormente determinado. A partir destes dados, calculou-se a energia de ativação aparente (E_a) da reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase presente no filtrado de cultura, a qual pode ser descrita pela equação de Arrhenius (1):

$$AT = A e^{-E_a/RT} \quad (1),$$

sendo AT a atividade enzimática, A o fator pré-exponencial, E_a a energia de ativação, R a constante universal dos gases (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) e T a temperatura absoluta em Kelvin. Os dados foram plotados no gráfico de Arrhenius (ln AT x 1/T), no qual a inclinação da reta obtida é dada por $-E_a/R$.

Todos os testes foram realizados em duplicatas.

3.5.2 Estabilidade em diferentes valores de pH e estabilidade térmica

Para avaliar a estabilidade da lipase em relação ao pH, o filtrado de cultura foi incubado por 24 h, na ausência de substrato, a 4 °C. A atividade residual foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 7,0 °C. O filtrado foi incubado na proporção de 1:2 (v/v) com os mesmos tampões especificados no item 3.5.1.

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pela incubação do extrato bruto nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C, na ausência de substrato. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo variados, transferidas para banho de gelo e determinada a atividade

residual, em tampão McIlvaine pH 4,0 e a 70 °C. A partir destes resultados, foram calculadas a constante de inativação térmica (K_i) e o tempo de meia vida ($T_{1/2}$) da enzima nas temperaturas avaliadas, através das equações 2 e 3.

$$\ln A = \ln A_0 - K_i * t \quad (2),$$

em que: A é a atividade lipase no tempo t e A_0 é a atividade lipase no tempo zero;

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3).$$

Todos os testes foram realizados em duplicatas.

3.5.3 Estabilidade na presença de detergentes

O efeito de emulsificantes e surfactantes sobre a estabilidade lipase foi avaliado pela incubação do filtrado de cultura por 1h, a 25 °C. A atividade residual foi determinada em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. Foram testados dodecil sulfato de sódio (SDS), deoxicolato de sódio, goma arábica, TX-100, Tween 20 e Tween 80, nas concentrações finais de 0,5, 1,0 e 5,0 % (m/v). O controle consistiu na incubação do filtrado de cultura na ausência destas substâncias, nas mesmas condições dos ensaios. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.6 Purificação da lipase produzida por *Penicilium sect. Gracilentia* CBMAI 1583

3.6.1 Precipitação com sulfato de amônio

O estudo da precipitação com sulfato de amônio $[(NH_4)_2SO_4]$ foi realizado em diferentes faixas de fracionamento, compreendendo: de 0 a 30, de 30 a 60 e de 60 a 90 % de saturação; e de 0 a 50 e de 50 a 85 % de saturação. O sal, em sua forma pulverizada, foi vagarosamente adicionado ao filtrado de cultura, sob agitação lenta em banho de gelo, em quantidades suficientes para se atingir as faixas especificadas. Após completa dissolução do sal, as soluções permaneceram em repouso por pelo menos 2 h, a 4 °C, sendo então centrifugadas a 8500 rpm (centrífuga Sorvall RC 5B Plus), durante 20 minutos, também a 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo quantificadas as atividades lipase nos precipitados e sobrenadantes.

3.6.2 Ensaio do teste em tubo para seleção da resina hidrofóbica e das condições de ligação e liberação da enzima

A fim de verificar as melhores condições de ligação da enzima às resinas hidrofóbicas e sua recuperação, o filtrado de cultura dialisado contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 por 6 horas, com trocas a cada 2 h, foi submetido a um teste em tubo de ensaio.

As resinas fenil Sepharose 6 Fast Flow (high sub) e octil Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) foram equilibradas no mesmo tampão da diálise, na ausência e na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M. As amostras (1,6 U de enzima) foram adicionadas às resinas (1 mL) e agitadas por alguns minutos. Após decantação das resinas por cerca de 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e a resina lavada com tampão sem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A enzima adsorvida foi eluída com uma solução de 1 % (m/v) de TX-100 em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. A atividade lipase foi determinada nos sobrenadantes antes e após a adição do detergente.

3.6.3 Cromatografias de interação hidrofóbica

O filtrado de cultura foi dialisado contra tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 por 6 h, sendo realizadas trocas a cada 2 h. Após a diálise, amostras foram aplicadas em duas colunas da GE Healthcare pré-empacotadas com octil agarose (HiprepTM 16/10 Octyl Sepharose FF fast flow) e fenil agarose (HiprepTM 16/10 Phenyl Sepharose FF). Ambas as colunas apresentavam as dimensões 2,0 x 20,0 cm (diâmetro x altura) e foram previamente equilibradas em solução de acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. A vazão foi ajustada para 2,5 mL.min⁻¹ com o auxílio de uma bomba peristáltica, sendo coletadas frações de 3,0 mL. A eluição das proteínas não adsorvidas foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm.

Após a lavagem das colunas com este mesmo tampão, as proteínas adsorvidas foram eluídas com 100 mL de gradiente linear crescente de 0 a 1 % (m/v) de TX-100 no mesmo tampão. Procedeu-se, então, a determinação da atividade enzimática nas frações eluídas e as frações correspondentes ao pico de atividade foram reunidas. Nas etapas de eluição, a leitura de absorbância a 280 nm não foi realizada, pois o detergente utilizado também apresenta absorção neste comprimento de onda.

3.6.4 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica com octil agarose foi liofilizada, suspensa em 3 mL de tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 contendo 1 % (m/v) de TX-100 e aplicada em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-100 (GE Healthcare), equilibrada no mesmo tampão. O detergente aplicado à amostra também foi adicionado ao tampão de eluição, na tentativa de inibir ou minimizar o comportamento de agregação das moléculas de lipase. Essa coluna, com dimensões 2,6 x 64 cm (diâmetro x altura), apresenta limite de exclusão molecular de 4 a 150 kDa. A vazão foi ajustada para 19,8 mL.h⁻¹ com o auxílio de uma bomba peristáltica, sendo coletadas frações de 3,0 mL. Procedeu-se, em seguida, a determinação da atividade enzimática nas frações coletadas e as frações correspondentes ao pico de atividade foram reunidas.

3.6.5 Remoção do detergente TX-100 para caracterização eletroforética

O detergente não iônico TX-100 presente na amostra, proveniente das etapas cromatográficas, causa distúrbios no padrão de bandas em uma eletroforese, sendo necessária sua remoção antes desse procedimento. Para tal, clorofórmio foi adicionado à amostra na proporção de 1:1 (v/v), sendo agitados por alguns segundos com o auxílio de um vortex e centrifugados a 3000 rpm (Sorvall BIOFUGE Primo R) por 30 minutos, a 4 °C. A fase superior continha a solução enzimática, com uma porcentagem de TX-100 residual inferior a 0,03 %, pois a maior parte do detergente permanece na fase orgânica, segundo Horikawa e Ogawara (1979). Para garantir uma remoção mais eficiente, este sobrenadante foi submetido à resina HiPPR Detergent Removal Spin Columns (PIERCETM ThermoScientific), segundo as instruções do fabricante. A amostra livre de detergente foi utilizada para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS e do zimograma.

3.6.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os estágios de purificação da lipase foram acompanhados por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes, segundo metodologia descrita por Hames (1987). As amostras foram liofilizadas, ressuspensas em 20µL de tampão de amostra (glicerol 27 %, SDS 6 %, β-mercaptoetanol 10 % e azul de bromofenol 0,01 % em tampão

Tris-HCl 0,12 M pH 6,8) e aquecidas durante 5 minutos em água fervente. A eletroforese foi realizada com um gel de empilhamento de 3,75 % de poliacrilamida e um gel de resolução com gradiente de concentração de 8 a 18 % de poliacrilamida. O tampão do reservatório era composto por: Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1 %, em pH 8,3. Para o gel de empilhamento a corrente elétrica foi mantida em 70 V e para o gel de resolução em 100 V. Após a corrida, os géis foram corados com *coomassie brilliant blue R-250* 0,1 % (m/v) em metanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v) por 1 h, e descorados com uma solução de etanol: ácido acético: água (3:1:6, v/v/v), até a visualização das bandas protéicas (HAMES; RICKWOOD, 1990).

3.6.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição não denaturante (zimograma)

Uma eletroforese em condição não denaturante foi realizada, a fim de se verificar quais bandas possuíam atividade lipase. Para tal, seguiu-se o mesmo protocolo do SDS-PAGE (item 3.6.6), porém o tampão de amostra não continha β -mercaptoetanol e continha apenas 0,05 % de SDS. Os géis de empilhamento e resolução e o tampão de corrida foram preparados sem SDS. Após a corrida, o gel foi lavado com uma solução de 1 % (m/v) de TX-100, para retirada do SDS, seguido por lavagens sucessivas com água destilada.

Os procedimentos para revelação de atividade no gel foram baseados nas reações de hidrólise e esterificação. Para a reação de hidrólise, os substratos utilizados foram α e β -naftil acetato, segundo protocolo para esterases descrito por Mueller et al. (1975), com modificações. Neste caso, o meio reacional foi composto por 25 mg de α ou β -naftil acetato solubilizado em 1 mL de 1-propanol, e então diluído a 50 mL com tampão McIlvaine pH 7,0 contendo 25 mg do corante *fast blue RR*. O gel foi incubado neste meio reacional a 37 °C, até visualização satisfatória das bandas, sendo a reação interrompida por imersão do gel em solução de ácido acético 7,5 % (v/v). Para a reação de esterificação, empregou-se uma modificação do método proposto por Kown et al. (2011). O meio reacional utilizado continha 1,5 % (m/v) de ácido oleico (18:1 Δ^9) e 1,5 % (v/v) de octanol em tampão McIlvaine pH 6,0. Para emulsificação dos substratos, o meio reacional foi submetido a ultrassom por 2 h, em banho maria a temperatura ambiente (Banho Branson 5510). O gel foi incubado nessa solução por 13 h a 37 °C para visualização das bandas.

3.7 Caracterização bioquímica da lipase purificada

Com exceção das amostras utilizadas para caracterização eletroforética e cinética enzimática, todas as demais amostras caracterizadas continham, aproximadamente, 0,5 % (m/v) de TX-100.

3.7.1 Estimativa da massa molecular

A massa molecular da lipase em questão foi estimada através de dois métodos distintos: SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular, conforme metodologias anteriormente descritas.

Para SDS-PAGE, a massa molar foi estimada a partir do gráfico do logaritmo da massa molecular das proteínas padrões (Kit SDS-PAGE Low Molecular Weight, Amersham Biosciences), contra suas respectivas mobilidades em relação a do azul de bromofenol. As proteínas padrão utilizadas foram: fosforilase b (97 kDa); albumina (66 kDa); ovalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (30 kDa); inibidor de tripsina (20,1 kDa); e α -lactoalbumina (14,4 kDa).

Para cromatografia de exclusão molecular, padrões de proteínas de baixa massa molecular (Kit Gel Filtration Low Molecular Weight, Sigma) foram aplicados na coluna empacotada com Sephadex G-100. Os volumes de eluição de cada proteína (V_e) e do corante *blue dextran* (V_0) foram medidos para cálculo da relação V_e/V_0 . A massa molecular da enzima foi estimada a partir do gráfico do logaritmo da massa molecular contra a relação V_e/V_0 das proteínas padrões (ANDREWS, 1964).

3.7.2 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

O pH e a temperatura ótimos de atividade e a E_a da lipase purificada foram determinados conforme metodologia utilizada para o filtrado de cultura, descrita no item 3.5.1.

3.7.3. Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica

A estabilidade em diferentes pH e a estabilidade térmica da lipase purificada foram avaliadas conforme proposto para o filtrado de cultura (item 3.5.2).

3.7.4 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre atividade enzimática

O efeito de substâncias e íons metálicos foi avaliado pela adição destes ao meio reacional de determinação da atividade enzimática. Foram avaliadas as substâncias: dodecil

sulfato de sódio (SDS), Tween 20, Tween 80, TX-100, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), 1,4-ditiotreitol (DTT), β -mercaptoetanol e uréia; e os sais íons metálicos: cloreto de mercúrio II, cloreto de cobre II, cloreto de magnésio, cloreto de cobalto II, cloreto de cálcio, cloreto de bário, cloreto de amônia, cloreto de sódio, sulfato de zinco, sulfato de manganês II, sulfato de magnésio e acetato de chumbo; todos nas concentrações de 2 e 10 mM. As atividades relativas foram calculadas em relação ao controle com adição de água ultrapura sem qualquer destas substâncias.

3.7.5 Estabilidade em solventes orgânicos

A estabilidade da lipase purificada foi avaliada nos seguintes solventes orgânicos: glicerol, propilenoglicol, metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, n-butanol, xilol, DMSO, acetonitrila, acetona, tolueno, n-hexano e iso-octano. A enzima foi incubada na presença de cada solvente na concentração de 10 % (v/v), a 25 °C, por 1h, com agitação e em frascos hermeticamente fechados. As atividades relativas foram calculadas em relação ao controle preparado na ausência desses solventes, com adição de água ultrapura para manter a diluição.

3.7.6 Especificidade por substratos sintéticos

A especificidade da lipase purificada foi avaliada a partir da quantificação da atividade enzimática sobre os substratos sintéticos ésteres de p-nitrofenila decanoato, laurato, miristato, palmitato e estearato, todos na concentração de 0,5 mM. Os substratos esterificados de cadeias carbônicas curtas (acetato, butirato e octanoato) não foram avaliados porque sofreram hidrólise espontânea nas condições do ensaio.

3.7.7 Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos aparentes, constante de Michaelis-Menten (K_m) e velocidade máxima ($V_{máx}$), foram determinados a partir da determinação da atividade lipase em várias concentrações do substrato p-nitrofenil palmitato, de acordo com representação gráfica proposta por Lineweaver-Burk (LINEWEAVER; BURK, 1934). Os experimentos foram realizados com amostras contendo, aproximadamente, 0,5 % (m/v) de TX-100 e na ausência deste detergente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

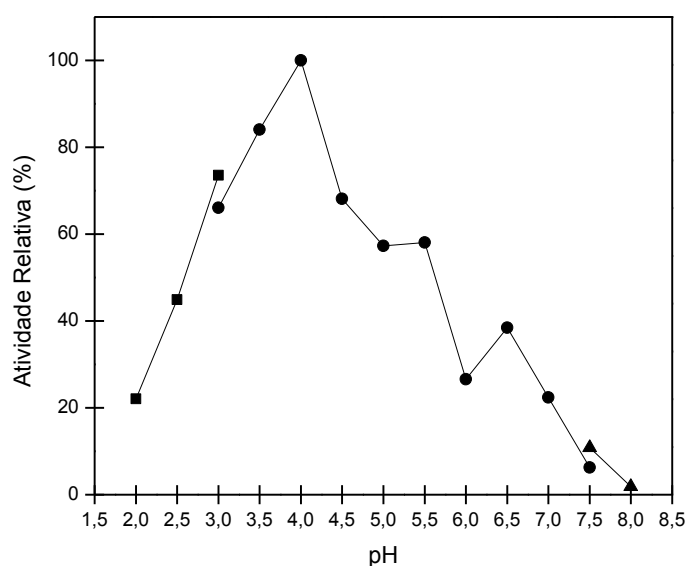
4.1 Caracterização bioquímica parcial da lipase presente no filtrado de cultura

O conhecimento de algumas características bioquímicas das enzimas é importante para delinear as estratégias de purificação, além de serem essenciais para se determinar aplicações adequadas. Assim, o filtrado de cultura foi caracterizado em relação ao pH e a temperatura ótimos de atividade lipase, bem como à estabilidade em diferentes pH, temperaturas e na presença de emulsificantes e surfactantes.

4.1.1 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

O pH do meio exerce grande influência sobre a atividade enzimática, pois interfere na carga líquida das proteínas, modificando as forças eletrostáticas que estabilizam a estrutura proteica (NELSON; COX, 2014). Além disso, o pH interfere no estado de protonação dos resíduos de aminoácidos da tríade catalítica. A atividade ótima de catálise da lipase produzida pela linhagem de *Penicillium* em questão foi determinada com a enzima presente no filtrado de cultura, obtido nas melhores condições de cultivo para produção dessa enzima (**Figura 2**).

Figura 2 – Influência do pH de reação sobre a atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.



Ensaio de atividade realizados a 37 °C, nos tampões: (■) Glicina-HCl 0,1 M, (●) McIlvaine e (▲) Tris-HCl 0,5 M. 100 % de atividade corresponde a 6,84 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. Condições de cultivo: pH 5,5, a 28°C, agitação de 160 rpm por 3 dias.

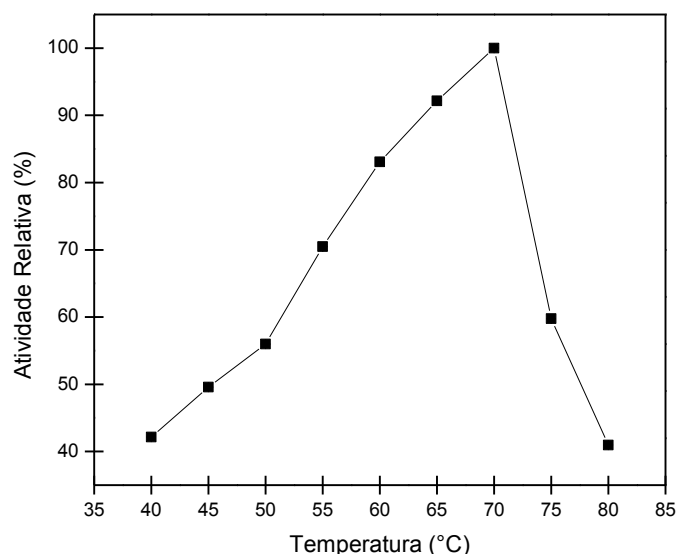
Nas condições dos ensaios, o pH ótimo da lipase avaliada foi 4,0, o que a diferencia da maioria das lipases produzidas por fungos do gênero *Penicillium*. Geralmente, essas enzimas se apresentam de neutras à alcalinas, sendo que o pH ótimo normalmente varia de 7,0 a 10,0 (LI; ZONG, 2010). No entanto, algumas lipases ácidas desse gênero foram reportadas na literatura, como as lipases de *Penicillium chrysogenum* 9' (BANCERZ et al., 2005), *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et al., 2009) e *Penicillium* sp (WOLSKI et al., 2009), as quais apresentaram pH ótimo 5,0, de 4,0 a 5,0 e de 4,9 a 5,5, respectivamente.

É possível observar também na **Figura 2** que a lipase de *Penicillium* sect. Gracilentia CBMAI 1583 se mantém com atividade elevada na faixa de pH de 3,0 a 4,5, mantendo mais de 60 % da atividade relativa. Tal fato está de acordo com o descrito na literatura para lipases de outros fungos desse mesmo gênero. A lipase de *P. citrinum*, descrita por Maliszewska e Mastalerz (1992), apresentou atividade relativa acima de 60 % entre pH 5,0 e 7,0, e a lipase de *Penicillium* sp. DS-39, estudada por Dheeman et al. (2011), manteve esse percentual de atividade entre pH 5,0 e 6,5.

Além do pH, a temperatura também é um fator que influencia decisivamente a catálise de uma enzima. Sua função e atividade estão relacionadas com sua estrutura tridimensional, a qual é mantida por interações não covalentes entre seus átomos. A temperatura atua sobre essas interações, sendo que temperaturas muito elevadas podem desestruturar a forma tridimensional nativa, causando desnaturação, com consequente perda da atividade enzimática (NELSON; COX, 2011). Já temperaturas muito baixas podem não fornecer energia suficiente para que a catálise ocorra, impossibilitando a ação das enzimas. Dessa maneira, conhecer a temperatura ótima de uma enzima é importante para garantir condições adequadas de catálise e possibilitar que ela seja utilizada em processos de interesse.

A **Figura 3** apresenta a atividade lipase em diferentes temperaturas, sendo que a atividade ótima de catálise foi atingida a 70 °C. Essa temperatura ótima é elevada para uma enzima de um fungo mesofílico, cuja temperatura ótima de crescimento é de 30 °C (TURATI, 2012). Nesta figura é possível observar que a lipase mantém elevada atividade em uma ampla faixa de temperatura, mantendo mais de 60 % de sua atividade entre 53 e 75 °C.

Figura 3 – Influência da temperatura de reação sobre atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.



Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. 100 % de atividade corresponde a $12,77 \text{ U mL}^{-1}$. Condições de cultivo: pH 5,5, a 28°C , agitação de 160 rpm por 3 dias.

A temperatura ótima de catálise para lipases varia consideravelmente entre aquelas produzidas pelas diferentes espécies de *Penicillium*, sendo citadas na literatura temperaturas de 25 a 60°C . Porém, a faixa entre 30 e 45°C é a mais comumente verificada (LI; ZONG, 2010). As temperaturas ótimas mais elevadas reportadas para lipases de *Penicillium* foram 50°C para a de *Penicillium simplicissimum* (GUTARRA et al., 2009) e 60°C para a de *Penicillium aurantiogriseum* (LIMA et al., 2004). Neste contexto, a lipase estudada no presente trabalho se destaca, apresentando uma temperatura ótima de atividade bem acima da maioria das lipases descritas na literatura para fungos do mesmo gênero, sendo esta a primeira lipase de *Penicillium* com atividade ótima a 70°C .

A **Tabela 1**, modificada de Li e Zong (2010), mostra o pH e temperatura ótimos de lipases de alguns fungos do gênero *Penicillium* descritas na literatura.

Tabela 1 – pH e temperatura ótimos de atividade de lipases de fungos do gênero *Penicillium*.

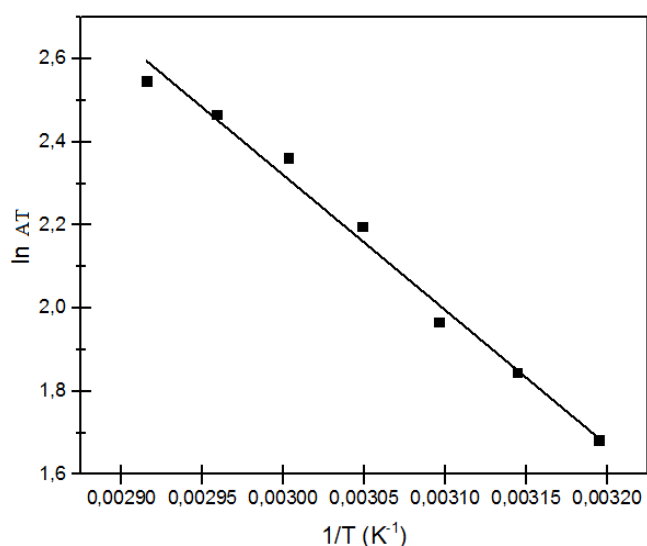
Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
<i>Penicillium abeanum</i>	7,0-8,0	25-30	SUGIHARA et al. (1996)
<i>Penicillium camembertii</i> Thom PG-3	8,0	48	TAN et al. (2004)
<i>Penicillium candidum</i>	9,0	35	RUIZ et al. (2001)
<i>Penicillium caseicolum</i>	9,0	35	ALHIR et al. (1990)
<i>Penicillium chrysogenum</i> 9'	5,0	30	BANCERZ et al. (2005)
<i>Penicillium citrinum</i>	8,0	34-37	PIMENTEL et al. (1996)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	8,0	60	LIMA et al. (2004)
<i>Penicillium cyclopium</i>	7,0	37	DRUET et al. (1996)
<i>Penicillium expansum</i>	9,5	35	TANG et al. (2007)
<i>Penicillium roqueforti</i>	6,0-7,0	35	MASE et al. (1995)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	4,0-5,0	50	GUTARRA et al. (2009)
<i>Penicillium verrucosum</i>	8,5	42	MENONCIN et al. (2010)
<i>Penicillium wortmanii</i>	7,0	45	COSTA; PERALTA (1999)
<i>Penicillium</i> sect. Gracilentia CBMAI 1583	4,0	70	Este trabalho

Fonte: Modificada de Li e Zong (2010).

A energia de ativação aparente da reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase presente no filtrado de cultura é igual a $27,01 \text{ kJ.mol}^{-1}$, calculada pelo gráfico de Arrhenius (**Figura 4**) construído a partir dos dados apresentados na **Figura 3**. O termo “aparente” utilizado para parâmetros cinéticos de lipases será explicado na seção **4.3.7**.

A energia de ativação de um sistema catalítico depende de fatores como a origem da enzima, a quantidade de catalisador adicionado ao sistema, o estado do substrato e as propriedades do solvente empregado. A energia de ativação da reação de hidrólise do pNPP catalisada por lipases se encontra na faixa de 20 a 40 KJ.mol^{-1} (GUO et al., 2015), o que está de acordo com o resultado encontrado neste trabalho. No entanto, energias de ativação mais baixas são reportadas na literatura. A energia de ativação desta reação catalisada pela lipase de *Candida rugosa* apresentou energia de ativação de $31,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (GUO et al., 2015), enquanto quando catalisada pela lipase de *Saccharomyces cerevisiae* a energia de ativação foi de $6,96 \text{ KJ.mol}^{-1}$ (ZENG et al., 2009).

Figura 4 – Gráfico de Arrhenius para a reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* presente no filtrado de cultura.



Ln AT é o logaritmo natural da atividade enzimática em determinada temperatura.

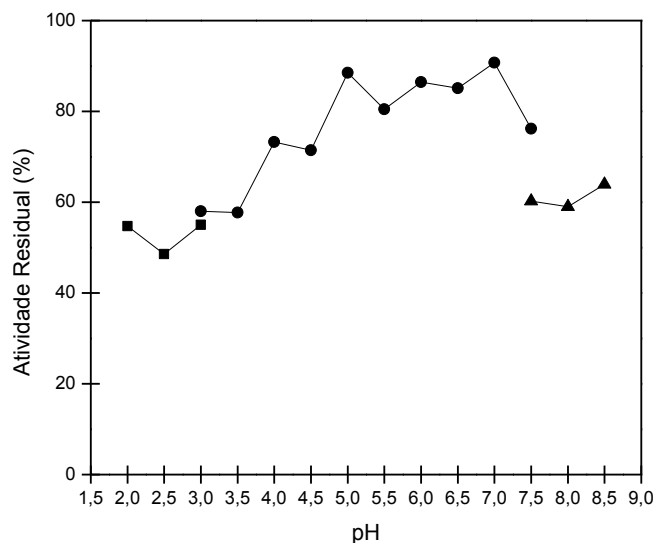
4.1.2 Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica

A estabilidade da lipase presente no filtrado de cultura foi avaliada em diferentes valores de pH, sendo incubada por 24 h a 4 °C, na ausência de substrato. Os resultados obtidos se encontram na **Figura 5**. A enzima em questão apresentou ampla estabilidade na faixa de pH testada, mantendo mais de 50 % de sua atividade em todos os valores de pH avaliados, exceto 2,5. A enzima foi mais estável nos pH de 5,0 a 7,0, nos quais manteve mais de 80 % da atividade inicial. Nos pH de 2,0 a 4,5, bem como de 7,5 a 8,5, uma queda de atividade foi observada em relação a faixa anteriormente citada, mas a lipase foi capaz de manter de mais de 50 % da atividade, com exceção do pH 2,5, no qual apenas 44,9 % da atividade inicial foi mantida. Também foi possível observar que o tipo de tampão influencia na estabilidade da enzima, em especial em tampões básicos. No pH 7,5, uma diferença de 16 % de atividade foi observada entre os tampões McIlvaine e Tris-HCl 0,5 M.

A estabilidade em relação ao pH das lipases descritas na literatura é muito variável, sendo encontradas enzimas que se mantêm estáveis em amplas faixas de pH e após muitas horas de incubação, e enzimas estáveis em faixas estreitas ou que se desnaturam após poucas horas de incubação. A lipase de *Penicillium expansum* DSM 1994 se mostrou estável do pH 6,0 ao 10,0 (STOCKLEIN et al., 1993) e a lipase II de *Penicillium cyclopium*

apresentou estabilidade na faixa de pH de 4,5 a 7,0, ambas a 25 °C (CHAHINIAN et al., 2000), ambas incubadas por longos períodos. Já a lipase de *Penicillium verrucosum* foi estável apenas entre pH 6,0 e 7,0 (MENONCIN et al., 2010), e a lipase I de *Penicillium cyclopium* foi estável por 1h em pH 8,0 (IBRIK et al., 1998), ambas também na temperatura de 25 °C.

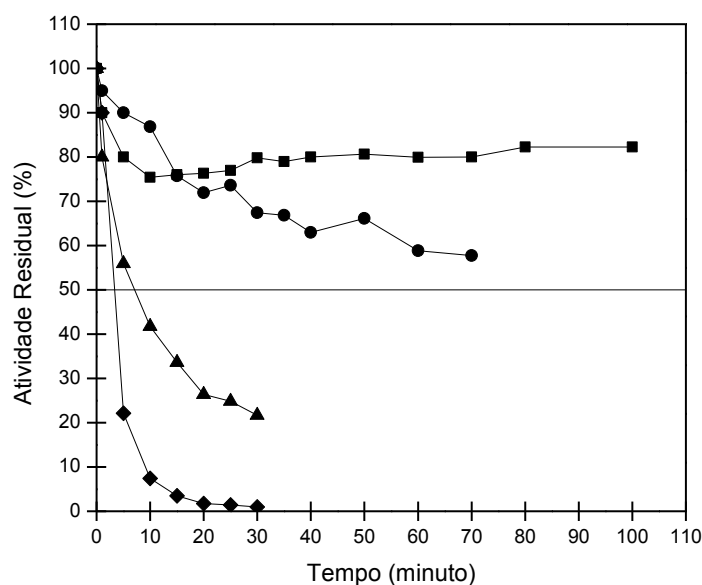
Figura 5 – Influência do pH sobre a estabilidade da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.



Amostras incubadas por 24 horas a 4 °C, na ausência de substrato, nos tampões: (■) Glicina-HCl 0,1 M, (●) McIlvaine e (▲) Tris-HCl 0,5 M. Ensaio de atividade realizado em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. 100 % de atividade corresponde a 12,77 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0 %. Condições de cultivo: pH 5,5, a 28°C, agitação de 160 rpm por 3 dias.

A estabilidade térmica da lipase presente no filtrado bruto foi avaliada nas temperaturas de 40, 50, 60 e 70 °C (**figura 6**), sendo calculadas a K_i e a $T_{1/2}$ da enzima em cada temperatura (**tabela 2**). Essa lipase foi bastante estável a 40 e a 50 °C, mantendo mais de 80 e 57 % da atividade inicial durante todo o período analisado (110 min), respectivamente. Já a 60 e a 70 °C sua estabilidade foi bastante reduzida, apresentando $T_{1/2}$ de 6,3 e 2,3 minutos, respectivamente.

Figura 6 – Influência da temperatura sobre a estabilidade da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado bruto.



Amostras incubadas a (■) 40 °C, (●) 50 °C, (▲) 60 °C e (◆) 70 °C, na ausência de substrato. Ensaio de atividade realizado em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. 100 % de atividade corresponde a 12,77 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da estabilidade térmica de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.

Temperatura (°C)	K _i (min ⁻¹)	T _(1/2)
40	0,002	6,1 h
50	0,008	1,5 h
60	0,110	6,3 min
70	0,300	2,3 min

K_d – Constante de desativação térmica; T_(1/2) – Meia vida. ND – não determinado.

A comparação entre as termoestabilidades das lipases descritas na literatura é dificultada pela ampla variação nas condições de incubação empregadas. Alguns autores expressam essa característica a temperaturas tão baixas quanto -10 °C, como Wolski et al. (2008) e Kempka et al. (2008). Esses autores reportaram que as lipases de uma espécie de *Penicillium* não identificada e de *Penicillium verrucosum* mantêm sua atividade inicial por

60 e 56 dias nesta temperatura, respectivamente. Outros autores descrevem a estabilidade a temperaturas mais elevadas, como Costa e Peralta (1999) e Gutarra et al. (2009), os quais reportaram meias vidas de 1 e 5h a 50 °C para as lipases de *P. simplicissimum* e *P. wortmanii*, respectivamente.

As lipases descritas na literatura como termoestáveis são, em geral, provenientes de bactérias, mais comumente do gênero *Bacillus*. Uma linhagem de *Bacillus* sp, também mesofílico, produz uma lipase considerada termoestável, cujas meias-vidas são de 2 h, 40 minutos e 18 minutos a 60, 65 e 70 °C, respectivamente (DOSANJH; KAUR, 2002). Uma lipase de *Bacillus coagulans* BTS-3 apresentou meia vida de 30 minutos a 60 °C, além de manter mais de 75 % da atividade inicial após 20 minutos de incubação a 70 °C (KUMAR et al., 2005).

4.1.3 Estabilidade na presença de detergentes

Os emulsificantes e surfactantes são muito utilizados em estudos com lipases. Essas substâncias são utilizadas para emulsificar os substratos altamente hidrofóbicos dos meios de cultura para produção de lipases e dos meios reacionais dos ensaios enzimáticos. Além disso, são empregados nos processos de purificação e em outros processos na tentativa de inibir o comportamento de agregação dessas enzimas (LI; ZONG, 2010). Conhecer o efeito de detergentes sobre a estabilidade de lipases também é importante para sua aplicação na indústria de detergentes (MOGENSEN et al., 2005).

No presente trabalho, a estabilidade da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura foi avaliada na presença de 0,5, 1,0 e 5,0 % (v/v) dos emulsificantes goma arábica e deoxicolato de sódio e dos surfactantes SDS, TX-100, Tween 20 e Tween 80, após 1 h de incubação a 25 °C (**Tabela 3**).

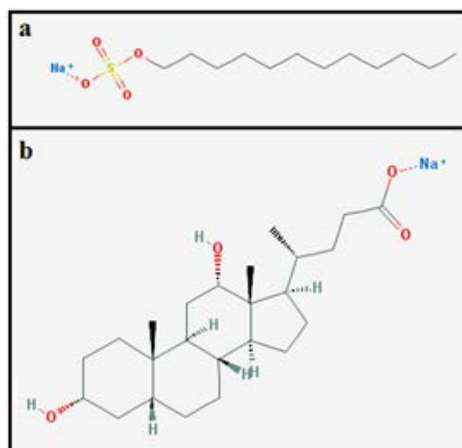
Tabela 3 – Influência de emulsificantes e surfactantes sobre estabilidade de lipase de *Penicillium* sect. Gracilentia CBMAI 1583 presente no filtrado de cultura.

Substância	Atividade Relativa (%)		
	0,5 %	1,0 %	5,0%
SDS	61,3	ND	ND
Deoxicolato de sódio	90,1	2,5	ND
Goma Arábica	94,9	106,2	41,4
TX-100	96,3	115,2	98,6
Tween 20	79,5	112,8	109,2
Tween 80	95,8	108,4	103,8

ND – Atividade não detectada. Amostras incubadas por 1 h a 25 °C, na ausência de substrato. Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 12,77 U.mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0 %.

Os agentes aniônicos, SDS e deoxicolato de sódio, afetaram negativamente a lipase, sendo detectadas atividades decrescentes com o aumento da concentração dessas substâncias. Com a adição de SDS foi possível detectar atividade após 1 h de incubação apenas na concentração de 0,5 %, sendo esta reduzida a 61,3 % da atividade inicial. No caso de deoxicolato de sódio, houve pouca redução da atividade enzimática na concentração de 0,5 %, porém apenas 2,5 % da atividade inicial foi recuperada com adição de 1,0 % dessa substância e não foi possível detectar atividade quando 5,0 % foi adicionado ao filtrado de cultura. Esses são conhecidos agentes desnaturantes, pois seus grupos carregados negativamente interagem com os resíduos de aminoácidos carregados positivamente, e seus grupos ricos em átomos de carbono interagem com os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (LU et al., 2010). Essas interações desestabilizam a estrutura tridimensional, ocasionando perda da atividade enzimática. As estruturas moleculares do SDS e do deoxicolato de sódio são encontradas na **Figura 7**.

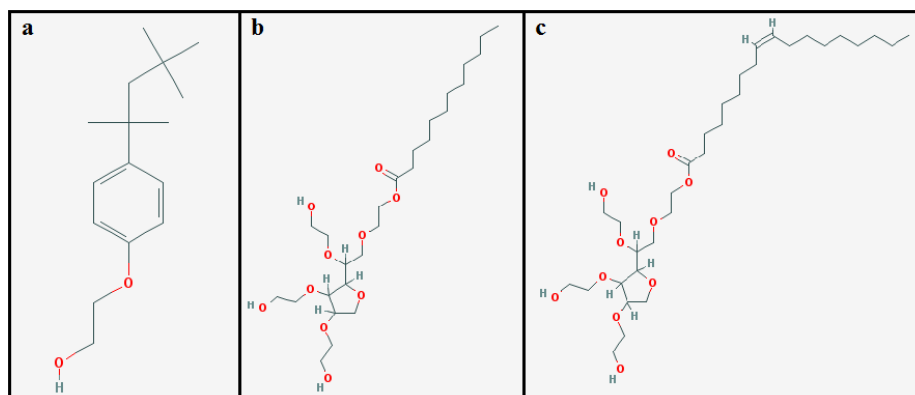
Figura 7 – Estrutura molecular do dodecil sulfato de sódio (a) e do deoxicolato de sódio (b).



Fonte: PubChem Compound (acesso em 02 maio 2014).

Já para os agentes não iônicos, como goma arábica e os detergentes TX-100, Tween 20 e Tween 80 (**Figura 8**), a lipase apresentou um padrão interessante de estabilidade. Primeiramente, houve leve queda na atividade na presença de 0,5 % dessas substâncias. Porém, em todos os casos houve ativação na concentração de 1 %, com destaque para TX-100, no qual a lipase apresentou 115,2 % de atividade em relação ao controle. Na concentração de 5 %, pode-se observar uma queda em relação à concentração de 1 %, porém ainda houve uma leve ativação na presença de Tween 20 e Tween 80 em relação ao controle. Nesta elevada concentração, goma arábica inibiu a atividade lipase, sendo detectada atividade residual de apenas 41,4 %.

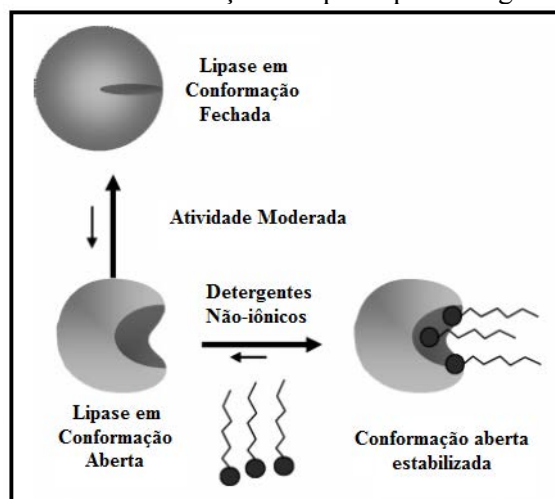
Figura 8 – Estrutura molecular de: TX-100 (a); Tween 20 (b); e Tween 80 (c).



Fonte: PubChem Compound (acesso em 02 maio 2014).

Este padrão de ativação seguido de inibição com o aumento da concentração do detergente foi descrito por Mogensen et al. (2005) para a lipase de *Thermomyces lanuginosus*. O fenômeno de ativação das lipases na presença de detergentes não iônicos está relacionado com o deslocamento do equilíbrio conformacional das lipases para a forma aberta. O caráter anfipático desses detergentes, com suas longas caudas hidrofóbicas, simula os substratos naturais das lipases, possibilitando a ligação das moléculas de detergente ao sítio ativo. Essa ligação estabiliza a forma aberta da enzima, expondo o sítio ativo e facilitando o acesso do substrato (**Figura 9**). A inibição ocorre quando moléculas adicionais se ligam ao sítio ativo, no caso de concentrações elevadas de detergente, bloqueando o acesso do substrato (MOGENSEN et al., 2005).

Figura 9 – Mecanismo de ativação de lipases por detergentes não iônicos.



Adaptado de FERNANDEZ-LORENTE et al. (2006).

4.2 Purificação da lipase produzida por *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583

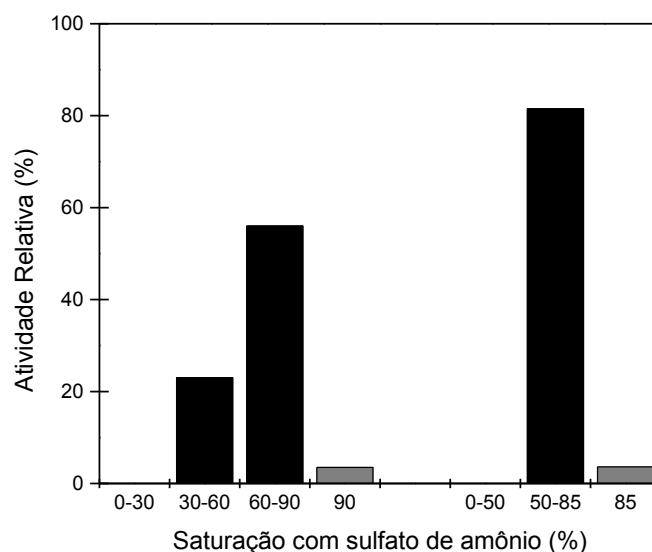
A purificação de diversas lipases é descrita na literatura, sendo que os métodos geralmente utilizados são ultrafiltração, precipitação e cromatografias de interação hidrofóbica, troca iônica e exclusão molecular (SHARMA et al., 2001). No presente trabalho, as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e as cromatografias de interação hidrofóbica e de exclusão molecular foram investigadas, visando à purificação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583.

4.2.1 Precipitação com sulfato de amônio

Foram realizadas duas tentativas de precipitação da lipase com sulfato de amônio pulverizado (**Figura 10**). Na primeira, foram utilizadas as faixas de saturação de 0 a 30 %, 30 a 60 % e 60 a 90 %, sendo dosadas as atividades nos precipitados e no sobrenadante de 90 % de saturação. Nesse caso, 22,9 % da atividade foi recuperada no precipitado de 30 a 60 % de saturação e 55,7 % no precipitado de 60 a 90 %, sendo que 3,5 % da atividade permaneceu no sobrenadante de 90 % de saturação.

A partir destes resultados, uma segunda tentativa foi realizada utilizando as faixas de saturação de 0 a 50 % e de 50 a 85 %. Nenhum precipitado foi obtido na faixa de saturação de 0 a 50 %, sendo a maior parte da enzima precipitada de 50 a 85 % (81,5 %). No sobrenadante de 85 %, 3,6 % da lipase foi recuperada, porção semelhante ao sobrenadante de 90 %.

Figura 10 – Precipitação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado bruto com sulfato de amônio pulverizado.



(■) Precipitado; (■) Sobrenadante. Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade total (100 %) corresponde a 121,27 U. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0 %.

A precipitação com sulfato de amônio foi utilizada como etapa de purificação de, pelo menos, 11 lipases de 11 fungos do gênero *Penicillium* (LI; ZONG, 2010). No entanto, esta técnica não foi incluída na estratégia de purificação da lipase em estudo, pois grande parte das proteínas presentes no filtrado de cultura precipitaram na mesma faixa de

precipitação da lipase, conforme visualizado através de SDS-PAGE (dado não apresentado). Além disso, esta etapa diminuiria o rendimento final da purificação, não se mostrando uma técnica eficiente de purificação para a presente enzima.

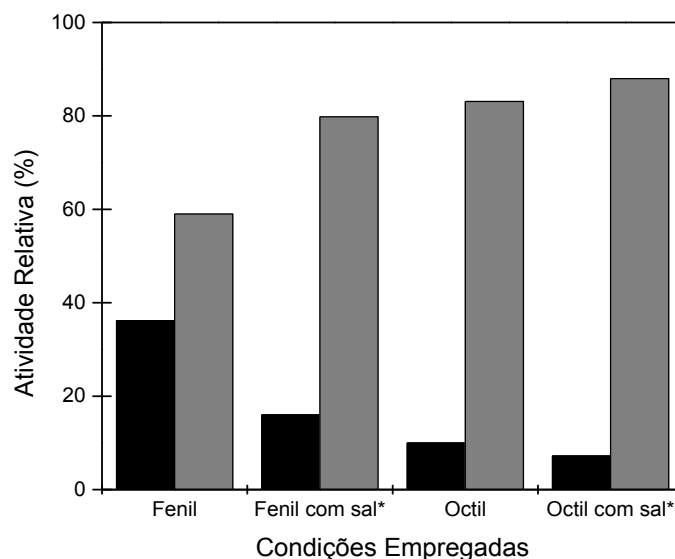
4.2.2 Ensaio do teste em tubo para seleção da resina hidrofóbica e das condições de ligação e liberação da enzima

É possível encontrar na literatura purificação de lipases através de diversas técnicas cromatográficas. Contudo, a cromatografia de interação hidrofóbica tem se mostrado bastante eficiente para a purificação dessas enzimas em particular, além de ser uma estratégia para imobilização e hiperativação de diversas lipases por adsorção (CUNHA et al., 2009).

Neste contexto, foi realizado um ensaio do teste em tubo para seleção das melhores condições de ligação e eluição da enzima em resinas hidrofóbicas, visando estabelecer uma metodologia para a realização de uma cromatografia de interação hidrofóbica. Foram testadas as resinas fenil e octil Sepharose, ambas na presença e ausência de sulfato de amônio 1 M. No caso de adsorção na presença do sal, não foi possível eluir a enzima com a retirada deste, pois na ausência do sal a enzima continuou a essas resinas. Portanto, em todos os casos a eluição foi realizada com uma solução de 1 % (m/v) de TX-100.

Em nenhuma condição empregada a enzima foi totalmente adsorvida à resina (**Figura 11**), o que pode indicar que a quantidade de amostra aplicada excedeu a capacidade de ligação das resinas. Porém, porcentagens elevadas de lipase foram recuperadas nas condições fenil com sal (79,8 %), octil sem sal (83,1 %) e octil com sal (88,0 %). Apesar da maior recuperação de atividade utilizando a resina octil Sepharose com adição de sulfato de amônio, optou-se por realizar a cromatografia na ausência deste sal, pois elevadas forças iônicas permitem também a adsorção não específica de outras proteínas menos hidrofóbicas. Ademais, na condição escolhida foi possível recuperar grande parte da atividade ligada à resina.

Figura 11 – Teste em tubo para seleção da resina Sepharose a ser utilizada na cromatografia de interação hidrofóbica para a purificação da lipase de *Penicillium sect. Gracilentia* CBMAI 1583 presente no filtrado bruto dialisado.



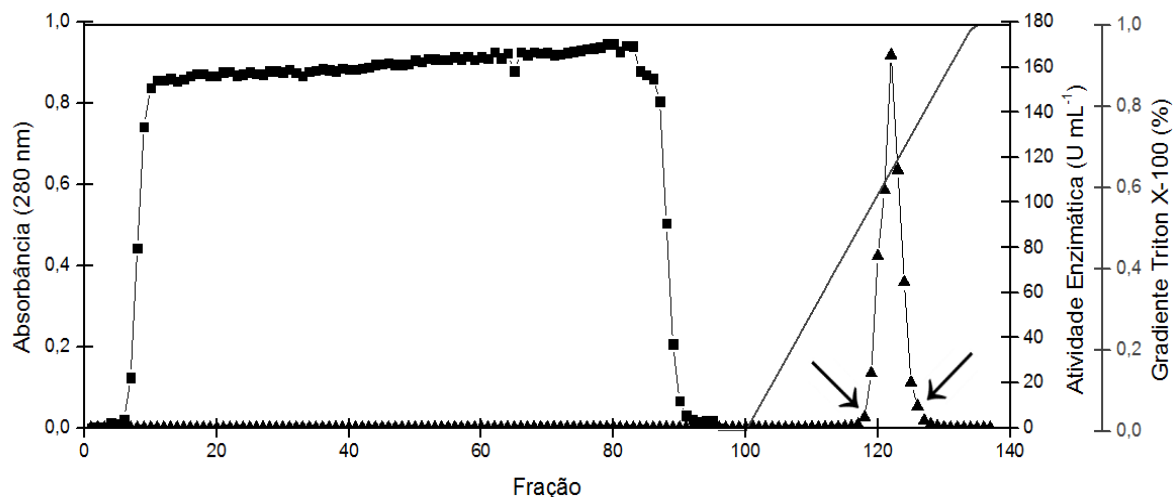
(■) Enzima não adsorvida; (▒) Enzima adsorvida e recuperada. *Com sal – Resina equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 com 1 M de sulfato de amônio; Fenil – Resina Fenil Sepharose 6 FF (high sub) e Octil – Resina Octil Sepharose 4 FF (GE Healthcare). A atividade total (100 %) corresponde a 1,64 U. Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0 %.

4.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica com octil Sepharose

A primeira etapa de purificação da lipase de *Penicillium sect. Gracilentia* CBMAI 1583 consistiu em uma cromatografia de interação hidrofóbica com a resina Octil Sepharose, sem adição de sal. A amostra e a coluna foram equilibradas em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo que as proteínas adsorvidas foram eluídas com gradiente crescente de 0 a 1 % (v/v) de TX-100, no mesmo tampão.

O perfil cromatográfico de eluição da lipase de *Penicillium sect. Gracilentia* CBMAI 1583 nestas condições está apresentado na **Figura 12**. É possível visualizar apenas um pico estreito de atividade lipase, a qual foi eluída com, aproximadamente, 0,65 % de TX-100. As frações com elevada atividade (setas) foram reunidas e utilizadas como amostra para cromatografia de exclusão molecular.

Figura 12 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 em coluna de interação hidrofóbica com a resina Octil Sepharose.



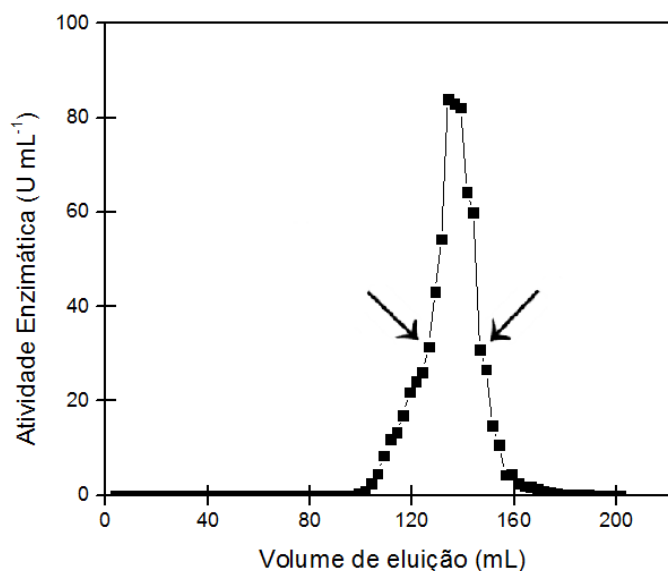
(■) Absorbância a 280 nm; (▲) Atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$); (—) Gradiente TX-100 (%). Coluna Octil Sepharose (HiprepTM 16/10 FF fast flow, GE Healthcare) equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. Eluição com gradiente de TX-100 no mesmo tampão. As setas indicam as frações reunidas. Ensaio de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C.

4.2.4 Cromatografia de exclusão molecular

A amostra proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica foi liofilizada, ressuspendida em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 contendo 1 % (v/v) de TX-100 e aplicada em uma coluna de filtração em gel empacotada com a resina Sephadex G-100. A atividade lipase foi verificada em um único pico, porém com uma base um pouco alargada (**Figura 13**). Na tentativa de priorizar a purificação, em detrimento do rendimento, foram reunidas as frações referentes aos volumes de eluição de 126,5 a 146,5 mL (setas). Essa amostra foi utilizada para caracterização eletroforética e bioquímica da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* sp CBMAI 1583.

Foi possível recuperar 38,1 % da atividade inicial de lipase e alcançar um fator de purificação de 51,5 após as duas etapas cromatográficas (**Tabela 4**).

Figura 13 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 em coluna de exclusão molecular.



(■) Atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$). Resina Sephadex G-100 (GE Healthcare) equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9 com 1 % de TX-100. As setas indicam as frações reunidas. Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C.

Tabela 4 – Primeira estratégia de purificação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583.

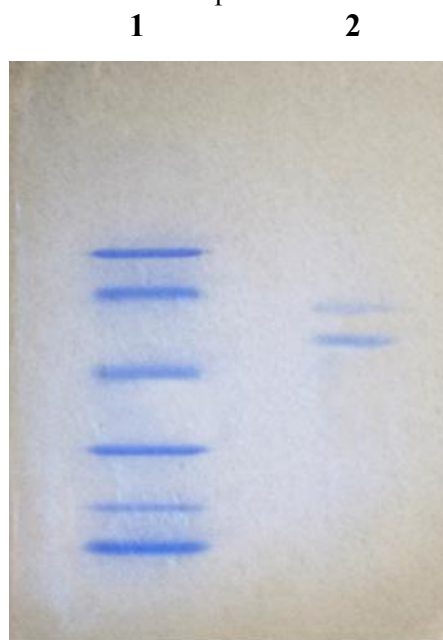
Etapa	Atividade Total (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica ($\text{U}\cdot\text{mg}\ \text{prot}^{-1}$)	Recuperação* (%)	Fator de purificação**
Filtrado dialisado	1039,5	135,0	7,7	100,0	1,0
Octil Sepharose	922,2	2,4	384,2	88,7	49,9
Sephadex G-100	396,5	1,0	396,5	38,1	51,5

Ensaios de atividade enzimática realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C.

4.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

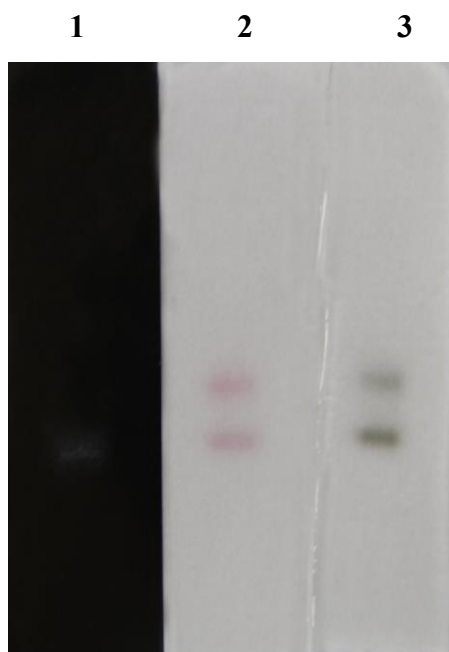
A amostra proveniente da cromatografia de exclusão molecular foi submetida a SDS-PAGE e a PAGE em condição não denaturante, sendo os perfis eletroforéticos apresentados nas **Figuras 14 e 15**.

Figura 14 – Perfil eletroforético SDS-PAGE de proteínas padrões (1) e da lipase parcialmente purificada (2) em gel gradiente com 8 a 18 % de poliacrilamida.



(1) Padrões de massas molares: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa); (2) amostra obtida após a etapa de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-100.

Figura 15 – Zimograma da amostra de lipase parcialmente purificada em gel gradiente de 8 a 18 % de poliacrilamida.



Amostra obtida após a etapa de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-100 revelada com: (1) reação de síntese entre ácido oleico e octanol; (2) reação de hidrólise de β -naftil acetato; (3) reação de hidrólise de α -naftil acetato.

É possível observar na **Figura 14** duas bandas protéicas, cujas massas moleculares foram estimadas em 65,4 e 52,9 kDa. A fim de se determinar se ambas ou apenas uma das bandas apresentavam atividade lipase, realizou-se um zimograma. Na **Figura 15** é possível visualizar duas bandas com atividade esterásica (colunas 2 e 3), mas apenas uma banda com atividade lipásica (coluna 1), essa última referente à precipitação *in situ* do éster oleato de octila.

A partir destes resultados, pode-se inferir que a linhagem de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 produz uma esterase (banda superior, 65,4 kDa) e uma lipase de especificidade reduzida (banda inferior, 52,9 kDa), já que a segunda foi capaz de hidrolisar ésteres de cadeia curta (α e β -naftil acetato) e esterificar um ácido graxo e um álcool de cadeias longas (ácido oleico e octanol).

Essas duas enzimas apresentaram características como hidrofobicidade e massa molecular próximas, pois não puderam ser separadas pelas técnicas de cromatografia de interação hidrofóbica com octil Sepharose e cromatografia de exclusão molecular. Sendo assim, o resultado desta estratégia de purificação foi uma lipase parcialmente purificada.

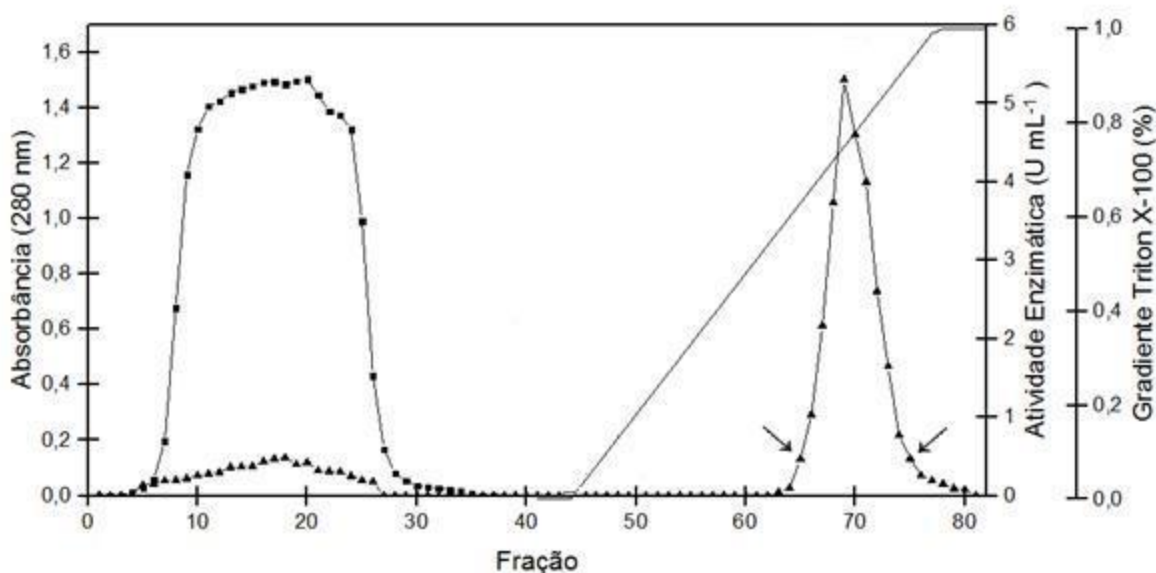
4.2.6 Cromatografia de interação hidrofóbica com fenil Sepharose

Na tentativa de promover uma adsorção mais seletiva, a resina fenil Sepharose foi escolhida para realizar uma nova cromatografia de interação hidrofóbica. Essa resina é menos hidrofóbica que a resina octil Sepharose, mas suficiente para permitir a adsorção da lipase altamente hidrofóbica, dificultando a adsorção de outras proteínas menos hidrofóbicas como a esterase presente na amostra. Para tal, amostra e coluna foram equilibradas em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9, sendo as proteínas adsorvidas eluídas com gradiente crescente de 0 a 1 % (v/v) de TX-100 no mesmo tampão.

O perfil cromatográfico de eluição da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilenta* CBMAI 1583 nestas condições está apresentado na **Figura 16**. É possível visualizar que parte da atividade lipase não se adsorveu à resina, sendo eluída nas frações iniciais juntamente com a maioria das outras proteínas da amostra (frações com elevada absorbância a 280 nm). No entanto, a maior parte da atividade enzimática foi eluída em apenas um pico estreito, com, aproximadamente, 0,75 % de TX-100. As frações com elevada atividade (setas) foram reunidas e utilizadas como amostra para SDS-PAGE. A análise eletroforética do filtrado dialisado e do “pool” resultante da reunião das frações é apresentada na **Figura 17**.

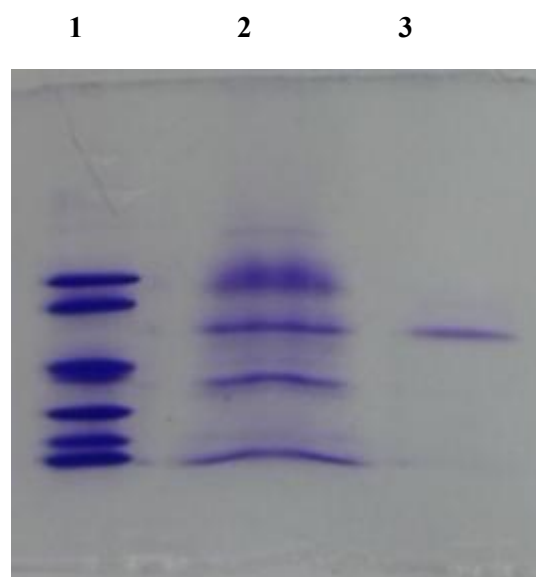
Somente uma banda proteica é visualizada na coluna referente ao “pool”, indicando que apenas uma proteína foi adsorvida à resina fenil agarose. Excelentes parâmetros de purificação foram alcançados, com 80,8 % da atividade inicial lipase recuperada e um fator de purificação de 516,1 após esta etapa cromatográfica (**Tabela 5**).

Figura 16 – Perfil cromatográfico de eluição da lipase de *Penicillium sect. Gracilentia* CBMAI 1583 em coluna de interação hidrofóbica com a resina fenil Sepharose.



(■) Absorbância a 280 nm; (▲) Atividade enzimática ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$); (—) Gradiente TX-100 (%). Coluna Fenil Sepharose (HíprepTM 16/10 FF fast flow, GE Healthcare) equilibrada em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9. Eluição com gradiente de TX-100 em mesmo tampão. As setas indicam as frações reunidas. Ensaio de atividade realizado em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C.

Figura 17 - Perfil eletroforético SDS-PAGE em gel gradiente com 8 a 18 % de poliacrilamida.



(1) Padrões de massas molares: fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e lactalbumina (14,4 kDa); (2) filtrado dialisado; (3) Pool 1; (4) Pool 2.

Tabela 5 – Segunda estratégia de purificação da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583.

Etapa	Atividade Total (U)	Proteínas Totais (mg)	Atividade Específica (U.mg prot ⁻¹)	Recuperação* (%)	Fator de purificação**
Filtrado dialisado	115,0	124,5	0,9	100,0	1,0
Fenil Sepharose	92,9	0,2	464,5	80,8	516,1

Ensaio de atividade enzimática realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C.

A cromatografia de interação hidrofóbica com a resina fenil Sepharose em baixa força iônica se mostrou uma estratégia eficaz de purificação para a lipase em questão, permitindo isolar a enzima em uma única etapa e com alto rendimento.

4.3 Caracterização bioquímica da lipase purificada

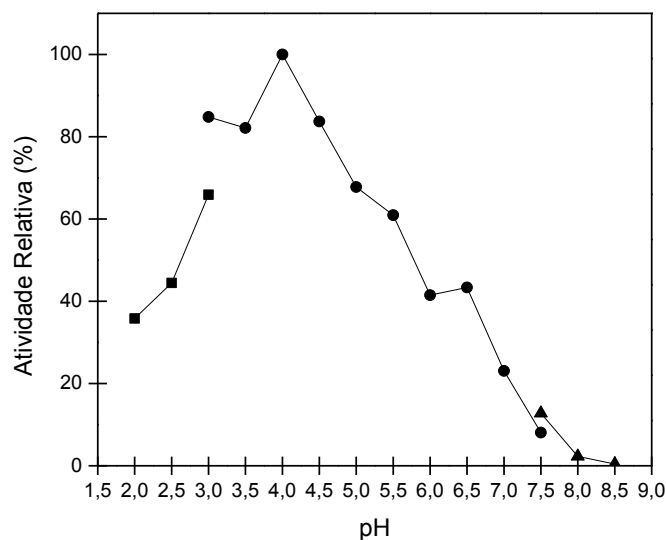
4.3.1 Estimativa da massa molecular

A massa molecular da lipase foi estimada com a enzima desnaturada (SDS-PAGE) e em sua forma nativa (cromatografia de exclusão molecular). De acordo com a primeira técnica, a massa molecular foi estimada em 52,9 kDa, enquanto com a segunda foi estimada em 85,3 kDa. A presença do detergente TX-100 na amostra pode ter alterado a massa molecular da enzima na forma nativa, uma vez que moléculas deste detergente pode se ligar ao sítio ativo de lipases (MOGENSEN et al., 2005). No entanto, este resultado pode, ainda, sugerir um comportamento de agregação das moléculas de lipase nas condições de eluição (solução com 1,0 % de TX-100 em tampão acetato de amônio 0,05 M pH 6,9), com predominância de dímeros. O comportamento de agregação de uma lipase de *C. rugosa* foi claramente demonstrado por Liou et al. (1998). Esta enzima foi eluída em quatro picos de atividade numa coluna empacotada com Sephadex G-200, cujas massas moleculares foram estimadas em 440, 240, 130 e 60 kDa. A análise em gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) indicou a presença de uma única banda de 60 kDa para os quatro picos anteriormente observados. Assim, em uma mesma amostra, foi possível identificar a presença de monômeros, dímeros, tetrâmeros e um pico chamado de polímero (440 kDa).

4.3.2 Determinação do pH e temperatura ótimos de atividade

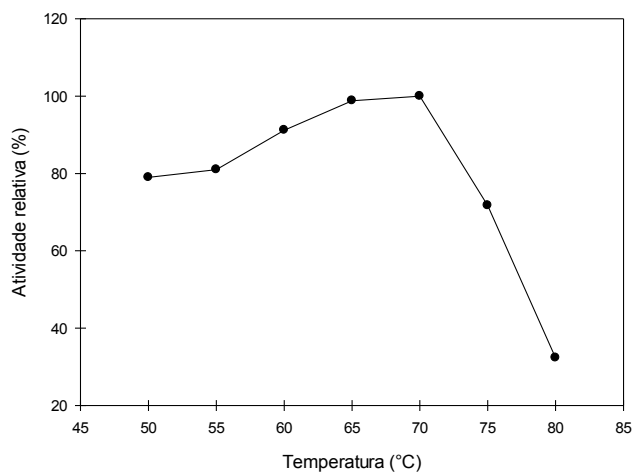
Os perfis de pH e temperatura de atividade da lipase purificada foram muito semelhantes daqueles observados para a lipase presente no filtrado de cultura. O pH ótimo também foi de 4,0, sendo que a enzima manteve mais de 60 % da atividade relativa entre os pH 3,0 e 5,5 (**Figura 18**). A temperatura ótima também foi de 70 °C, com elevadas atividades relativas até 75 °C (**Figura 19**). A 80 °C, a atividade foi de 32,3 % da máxima. No pH 3,0 houve diferença na atividade enzimática determinada nos diferentes tampões.

Figura 18 – Influência do pH de reação sobre atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.



Ensaio de atividade realizados a 37 °C, nos tampões: (■) Glicina-HCl 0,05 M, (●) McIlvaine e (▲) Tris-HCl 0,05 M. 100 % de atividade corresponde a 14,49 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0%.

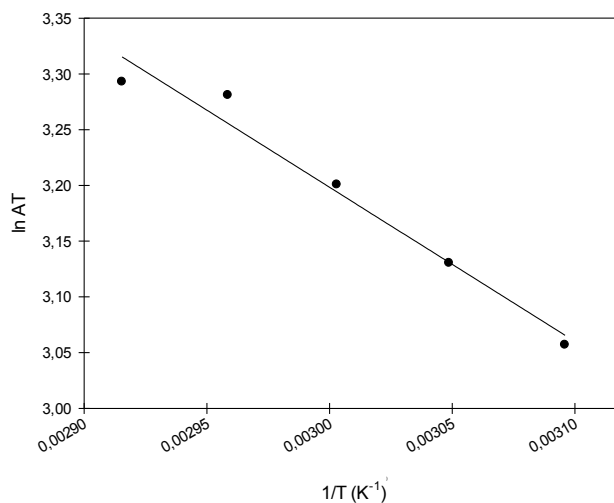
Figura 19 – Influência da temperatura de reação sobre atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.



(■) Atividade enzimática. Ensaio de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0. 100 % de atividade corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 1,0 %.

A energia de ativação aparente da reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase purificada é de 8,77 KJ.mol⁻¹, calculada pela inclinação da reta obtida no gráfico de Arrhenius (**Figura 20**).

Figura 20 – Gráfico de Arrhenius para a reação de hidrólise do pNPP catalisada pela lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* purificada.

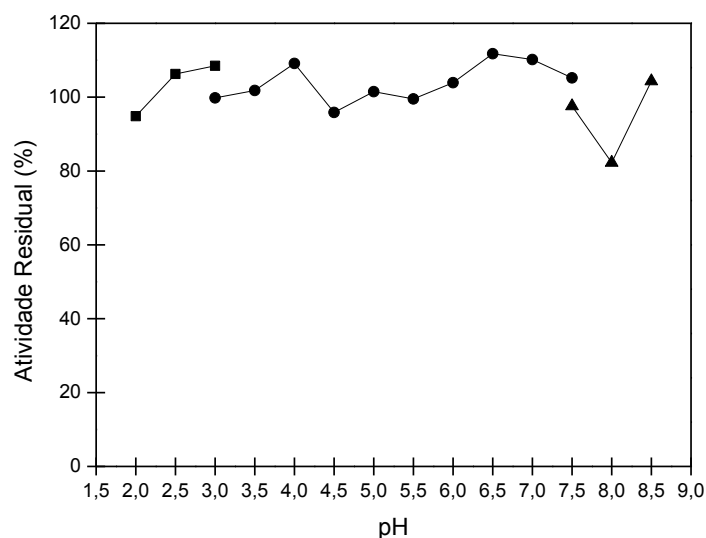


4.3.3. Estabilidade em diferentes pH e estabilidade térmica

Os perfis de estabilidade ao pH e à temperatura foram um pouco diferentes daqueles verificados para a enzima presente no filtrado bruto, sendo que a enzima purificada se mostrou mais estável ao pH e menos estável à temperatura.

A atividade lipase da enzima purificada apresentou maior estabilidade em toda a faixa de pH testada, mantendo mais de 80 % de atividade relativa em todos os pH. Na maioria dos pH a enzima purificada apresentou mais de 100 % de atividade, exceto 2,0, 4,5 e 8,0 (**Figura 21**).

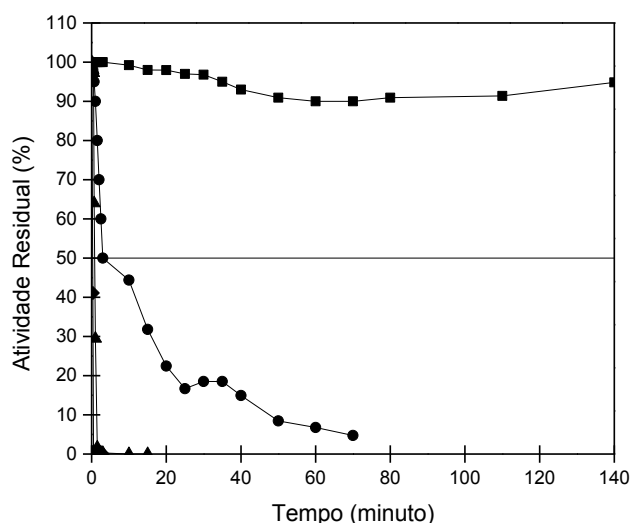
Figura 21 – Estabilidade ao pH da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.



Amostras incubadas por 24 horas a 4 °C, na ausência de substrato, nos tampões: (■) Glicina-HCl 0,1 M, (●) McIlvaine e (▲) Tris-HCl 0,05 M. Ensaio de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%.

No caso da estabilidade térmica, a enzima purificada se apresentou mais estável apenas a 40 °C, temperatura na qual manteve mais de 94 % da atividade inicial após 140 min. A 50, 60 e 70 °C esta amostra foi menos estável, com meias-vidas de apenas 4,1 minutos e 37 e 11 segundos, respectivamente (**Figura 22** e **Tabela 6**). Esse resultado pode estar relacionado a algum componente do meio de cultura, de interações proteína-proteína que possam ter atuado de maneira estabilizadora no filtrado bruto ou à perda de algum cofator durante o processo de purificação.

Figura 22 – Estabilidade térmica da lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.



Amostras incubadas a (■) 40 °C, (●) 50 °C, (▲) 60 °C e (◆) 70 °C, na ausência de substrato. Ensaio de atividade realizado em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da estabilidade térmica de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.

Temperatura (°C)	K _i (min ⁻¹)	T _(1/2)	R ²
40	ND	> 94 % após 140 min	-
50	0,167	4,1 min	0,95
60	1,107	37 s	0,88
70	3,759	11 s	0,95

K_a – Constante de desativação térmica; T_(1/2) – Meia vida. ND – não determinado.

4.3.4 Efeito de substâncias e íons metálicos sobre atividade enzimática

O efeito de diversas substâncias sobre a atividade da lipase purificada está apresentado na **Tabela 7**. Em geral, as substâncias testadas não exerceram muita influência sobre a atividade enzimática quando avaliadas na concentração de 2 mM, sendo mantida mais de 90 % da atividade em relação ao controle. No entanto, PMSF exerceu efeito inibidor sobre a atividade lipase, sendo observada apenas 43,0 % de atividade em relação ao controle na ausência desta substância, enquanto detergentes não iônicos como Tween 20 e Tween 80 exerceram um efeito ativador (115,6 % de atividade detectada). Na concentração de 10 mM, β-mercaptoetanol, uréia e Tween 20 não influenciaram a atividade

lipase, sendo observada mais de 90 % da atividade do controle. EDTA, DTT e Tween 80 apresentaram efeito inibidor pouco pronunciado, com atividades lipase próximas a 80 % da atividade do controle. No caso de PMSF, uma inibição pronunciada foi observada, sendo detectada apenas 13,9 % de atividade. Na presença de SDS não foi detectada atividade, o que pode ser atribuído à desnaturação da enzima.

Tabela 7 – Efeito de substâncias sobre a atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.

Substância	Atividade relativa (%)	
	2 mM	10 mM
EDTA	95,4	88,0
PMSF	43,0	13,9
β -Mercaptoetanol	93,3	93,7
DTT	91,9	86,0
Uréia	104,7	107,8
SDS	90,5	ND
Tween 20	115,6	98,7
Tween 80	115,6	82,0

Ensaio de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. ND: Atividade não detectada nas condições do ensaio.

O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) é uma substância conhecida por inibir serino proteases em geral, sendo inicialmente reportada como inibidora de esterases (acetilcolinesterase), quimiotripsina e tripsina (FARNEY; GOLD, 1963), apesar de também inibir algumas cisteíno proteases como a papaína (WHITAKER; PEREZ-VILLASEÑOR, 1968). No caso de serino proteases, a inibição é irreversível, pois a molécula se liga covalentemente à hidroxila do resíduo de serina do sítio ativo numa reação de sulfonilação, formando um derivado enzimático sulfonilado inativo (POWERS et al., 2002). As lipases são conhecidas serino hidrolases, com uma tríade catalítica geralmente formada por serina, histidina e aspartato/glutamato, também encontrada em serino proteases (OLLIS et al., 1992; HOLMQUIST, 2000). Portanto, o fato de PMSF inibir fortemente a atividade lipase

de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 indica que seu sítio ativo contém um resíduo de serina importante para a catálise.

A **Tabela 8** apresenta o efeito de íons metálicos sobre a atividade da lipase purificada. Na concentração de 2 mM, a maioria dos íons avaliados pouco alteraram a atividade enzimática, mas alguns exerceram efeito positivo sobre a atividade da enzima, com destaque para Ba^{2+} , o qual quase dobrou a atividade (183,9 %). Por outro lado, Ca^{2+} inibiu a atividade lipase, sendo detectada apenas 48,2 % da atividade do controle. Na concentração de 10 mM, Na^+ , NH_4^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} e Pb^{2+} estimularam a atividade enzimática, enquanto os demais íons inibiram fortemente a lipase, inclusive não sendo detectada atividade com Cu^{2+} e Ba^{2+} .

Tabela 8 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada.

Íons	Atividade relativa (%)	
	2 mM	10 mM
HgCl ₂	105,9	13,0
CuCl ₂	103,6	ND
CoCl ₂	110,1	61,9
NaCl	112,0	120,1
CaCl ₂	48,2	11,8
BaCl ₂	183,9	NA
NH ₄ Cl	110,3	114,6
ZnSO ₄	95,5	28,5
MnSO ₄	114,2	128,4
MgSO ₄	118,1	109,4
Pb(CH ₃ COO) ₂	110,7	108,4

Ensaio de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. ND: Atividade não detectada nas condições do ensaio. NA: não avaliado.

O efeito de íons sobre a atividade de lipases do gênero *Penicillium* é muito variável. Geralmente, o íon Ca^{2+} possui efeito estimulatório (LI; ZONG, 2010), como reportado para as lipases de *P. chrysogenum* 9^o e *P. candidum*, por Bancercz et al. (2005) e Ruiz et al. (2001), respectivamente. No entanto, a lipase de *P. aurantiogriseum* foi inibida por este

íon, bem como pelos íons Cu^{2+} e Ba^{2+} (LIMA et al., 2004), resultados semelhantes aos do presente trabalho. A lipase de *Penicillium abeanum* foi inibida por 1 mM de todos os íons testados (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mo^{2+} , Cd^{2+} , Sn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+}), com destaque para Hg^{2+} que inibiu 96 % da atividade enzimática (SUGIHARA et al., 1996). Íons Hg^{2+} também apresentaram efeito inibitório sobre as outras lipases anteriormente citadas, sendo este efeito associado à interação com grupos tiol de resíduos de cisteína importantes para a catálise (SUGIHARA et al., 1996).

4.3.5 Estabilidade em solventes orgânicos

Solventes orgânicos são amplamente utilizados em reações com lipases, pois facilitam o manejo dos substratos hidrofóbicos geralmente utilizados e podem modular e aprimorar a atividade e a seletividade da enzima. O efeito de solventes orgânicos a 10 % (v/v) sobre a estabilidade da lipase purificada está apresentado na **Tabela 9**. Nesta tabela, os solventes foram apresentados pelos valores crescentes de *Log P*. O *Log P* é o coeficiente de partição de um solvente particular entre n-octanol e água e, portanto, é um parâmetro quantitativo útil para representar a natureza hidrofóbica ou hidrofílica de uma dada substância (SANGSTER, 1989). Quanto mais negativo é o valor de *Log P*, mais hidrofílica é a substância, ao passo que quanto mais positivo, mais hidrofóbica.

Tabela 9 – Estabilidade de lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 em diferentes solventes orgânicos.

Solvente	<i>Log P</i>	Atividade relativa (%)
Glicerol	-1,67	72,8
DMSO	-1,38	98,4
Propilenoglicol	-0,92	75,9
Metanol	-0,76	71,3
Acetonitrila	-0,40	94,7
Etanol	-0,24	72,3
Acetona	-0,23	99,9
2-Propanol	0,07	72,7
1-Propanol	0,25	72,8
n-Butanol	0,80	37,9
Tolueno	2,50	95,9
Xilol	3,15	36,3
n-Hexano	3,50	111,3
Iso-octano	4,51	109,2

Incubação com 10 % (v/v) de solvente, a 25 °C por 1h em frascos hermeticamente fechados. Ensaios de atividade realizados em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. A atividade controle (100 %) corresponde a 26,92 U mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. *Log P*: logaritmo do coeficiente de partição de um solvente particular entre n-octanol e água (SANGSTER, 1989).

A lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 se apresentou estável na maioria dos solventes testados, sendo detectada mais de 70 % de atividade residual após incubação por 1 h a 25 °C. Apenas na presença de n-butanol e xilol a enzima apresentou perda de atividade pronunciada, com atividades residuais de apenas 37,9 e 36,3 %, respectivamente. Em geral, solventes polares são mais desestabilizantes para a estrutura protéica por retirarem a camada de solvatação de água que ajuda a proteger a estrutura nativa da enzima (CASTRO-OCHOA et al., 2005). Apesar deste efeito, a enzima se mostrou mais estável que outras reportadas na literatura, como, por exemplo, a lipase de *P. aurantiogriseum*, a qual apresentou nenhuma ou pouca atividade residual quando incubada por 1 h e a 28 °C nos solventes metanol, etanol, 1-propanol, acetona e n-butanol (LIMA et al., 2004).

Os solventes mais hidrofóbicos, n-hexano ($\text{Log } P = 3,50$) e iso-octano ($\text{Log } P = 4,51$), estimularam levemente a atividade lipase, com atividades de 111,3 e 109,2 %, respectivamente. Este fato pode estar relacionado com a ativação interfacial da lipase na presença de superfícies hidrofóbicas, alterando o equilíbrio entre as formas aberta e fechada da enzima e estabilizando a forma aberta, bem como pela modificação da solubilidade do substrato e dos produtos no meio de reação (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2011). Esse comportamento de ativação de lipase na presença de solventes hidrofóbicos também foi verificado para as lipases de *P. aurantiogriseum* (LIMA et al., 2004) e *P. chrysogenum* 9' (BANCERZ et al., 2005). Esta última sofreu desnaturação em meio contendo xilol, como a lipase estudada no presente trabalho.

Não foi possível observar uma relação entre os valores de $\text{Log } P$ e a atividade residual da lipase, mas a estabilidade apresentada por esta enzima em diversos solventes orgânicos sugere seu uso em reações em meios não aquosos, como sínteses orgânicas.

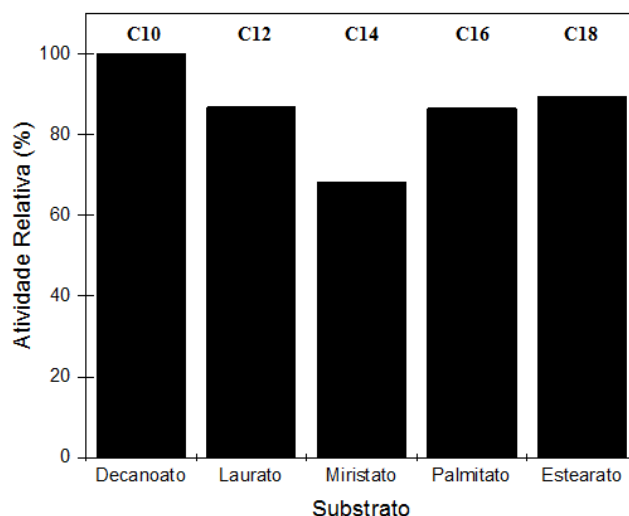
4.3.6 Especificidade por substratos sintéticos

A especificidade da lipase purificada foi estudada com p-nitrofenil ésteres de diferentes comprimentos de cadeia alquila e o resultado está apresentado na **Figura 23**. A maior atividade foi detectada com o p-nitrofenil decanoato, o qual foi tomado como 100 % de atividade. As condições do ensaio não possibilitaram dosar a atividade hidrolítica da lipase sobre ésteres de cadeia curta, uma vez que sofriam hidrólise espontânea na presença de tetraborato de sódio. Assim, não foi possível avaliar totalmente a preferência dessa

enzima, porém os dados apresentados sugerem maior afinidade por cadeias carbônicas médias em detrimento de cadeias longas.

A especificidade de lipases é variada: enquanto a lipase de *P. candidum* apresenta preferência por ésteres de p-nitrofenila de ácidos graxos de cadeia longa (C16) (RUIZ et al., 2001), a lipase de *P. roqueforti* IAM 7268 tem preferência por hidrolisar ésteres de cadeia curta (C4 e C6) (MASE et al. 1995).

Figura 23 – Atividade lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 purificada sobre diferentes substratos sintéticos.



Ésteres de p-nitrofenila na concentração final de 0,5 mM. Ensaio de atividade realizado em tampão McIlvaine pH 4,0 a 70 °C. 100 % de atividade corresponde a 39,46 U.mL⁻¹. Em todos os ensaios, o desvio padrão foi menor que 0,3%. C_ indica o número de carbonos na cadeia do ácido graxo esterificado.

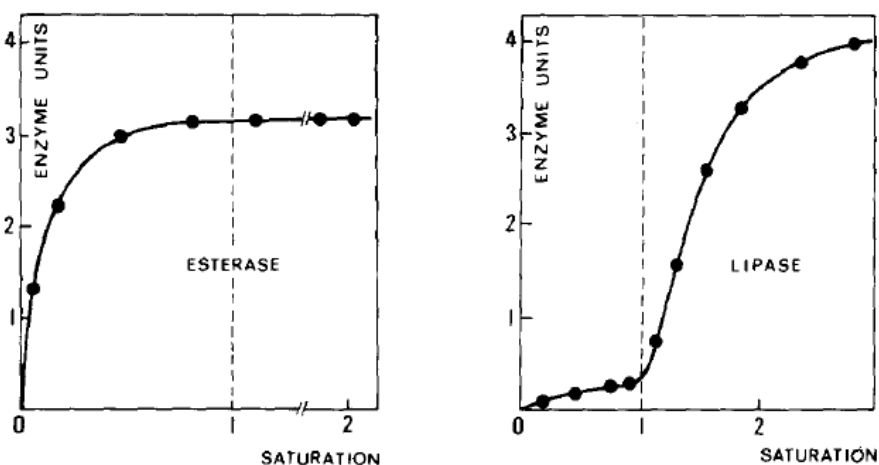
4.3.7 Cinética enzimática

O estudo da cinética enzimática é, geralmente, utilizado como ferramenta para entender um pouco sobre o mecanismo de ação de enzimas purificadas. O modelo proposto por Michaelis-Menten, no qual a relação entre a concentração de substrato e a velocidade inicial se aproxima de uma hipérbole retangular, explica a cinética de enzimas e substratos solúveis em água (NELSON; COX, 2014). O estudo da cinética de lipases é dificultado pelo fato dos substratos serem insolúveis em água, da enzima atuar em uma interface e da formação de agregados moleculares. Neste caso, a concentração efetiva de substrato corresponde ao número de moléculas por unidade de superfície, sendo que esta concentração não é aumentada apenas adicionando mais moléculas do substrato. Portanto,

não é possível saber quanto de enzima está efetivamente ligada ao substrato e, assim, K_m e $V_{m\max}$ para lipases são somente valores aparentes (VERGER, 1980).

Para comparar os comportamentos cinéticos de enzimas catalisando a hidrólise de substratos solúveis e insolúveis, Sarda e Desnuelle (1958) estudaram a hidrólise de triacetina por esterase hepática de cavalo e por lipase pancreática suína. A **Figura 24** ilustra estes comportamentos, salientando a concentração na qual ocorre saturação de substrato e este passa a se apresentar insolúvel (linha tracejada). A esterase apresentou um comportamento típico michaeliano, com uma relação hiperbólica entre concentração de substrato e atividade enzimática; enquanto a lipase descreveu uma curva sigmoide não-michaeliana, com aumento significativo da atividade após o limite de solubilidade do substrato.

Figura 24 – Hidrólise de triacetina por esterase hepática de cavalo e lipase pancreática suína: atividade enzimática em função da concentração do substrato.

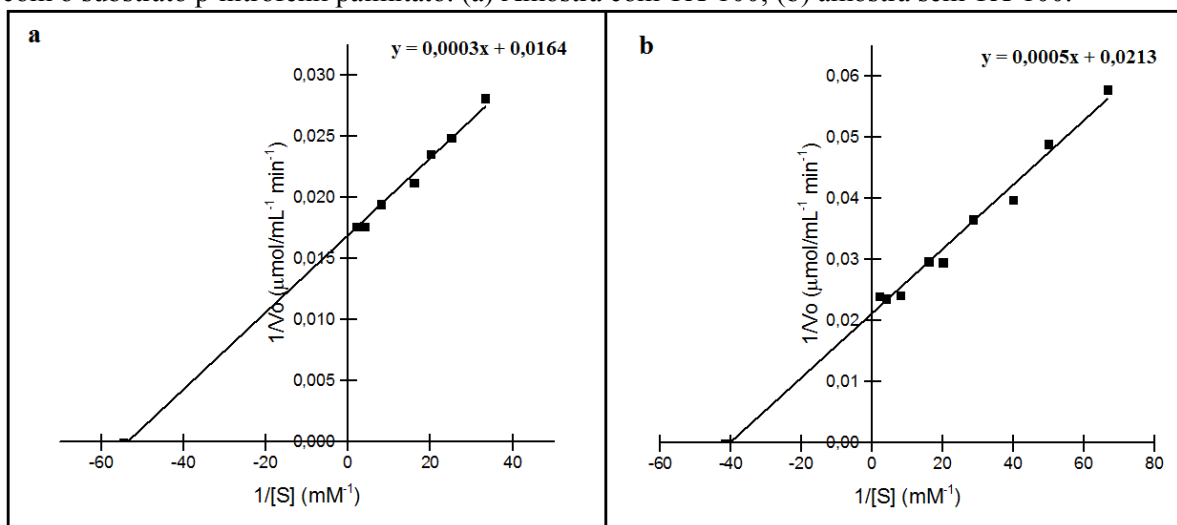


Fonte: VERGER, 1980.

Para distinguir da cinética clássica de Michaelis-Menten, as constantes cinéticas de lipases são chamadas de “aparentes”, uma vez que os substratos não são solúveis nos sistemas e a enzima pode formar agregados moleculares e atuar na interface.

A cinética enzimática da lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 foi estudada em duas condições: na presença de, aproximadamente, 0,5 % (m/v) de TX-100 remanescente da etapa de purificação; e na ausência deste detergente. Os gráficos duplo-recíprocos gerados são apresentados na **Figura 25** e os parâmetros cinéticos aparentes calculados se encontram na **Tabela 10**.

Figura 25 – Cinética enzimática de lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 com o substrato p-nitrofenil palmitato. (a) Amostra com TX-100; (b) amostra sem TX-100.



Atividade determinada em tampão McIlvaine pH 4,0, com 0,5 % (m/v) de TX-100, a 70 °C.

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos aparentes da lipase purificada de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583.

	Parâmetros cinéticos aparentes			
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Com TX-100	0,018	10050,4	886,25	$4,92 \times 10^7$
Sem TX-100	0,024	1281,0	1129,40	$4,70 \times 10^7$

A variação da velocidade inicial da lipase purificada em função da concentração de substrato resultou numa curva hiperbólica (dado não apresentado), cuja linearização foi possível através do gráfico duplo-recíproco ($R^2 = 0,99$, em ambos os casos avaliados). Estes dados sugerem um comportamento michaeliano desta enzima. A presença de TX-100 não afetou drasticamente a cinética enzimática, pois valores muito próximos de K_m , $V_{m\acute{a}x}$, k_{cat} e eficiência catalítica (relação k_{cat}/K_m) foram encontrados.

Alguns trabalhos reportados na literatura também descrevem que a cinética de algumas lipases segue o modelo de Michaelis-Menten. Kierkerls et al. (1990) classificaram a lipase pancreática suína como michaeliana, relatando que a área superficial disponível é o fator mais importante na determinação dos parâmetros cinéticos. Um trabalho interessante sobre a cinética de lipases foi realizado por Nini et al. (2001). Estes autores estudaram a

hidrólise de soluções e emulsões de três substratos (propionato de vinila, butirato de vinila e tripropionina) por diferentes lipases. Eles constataram que algumas lipases apresentam curvas hiperbólicas em gráficos de concentração de substrato *versus* velocidade inicial, seguindo o modelo de Michaelis-Menten (lipases de *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* A e fosfolipase pancreática de porco da Índia), enquanto outras apresentam curvas sigmoidais que se desviam do modelo cinético michaeliano (lipases pancreática humana, de *Thermomyces lanuginosa* e de *Penicillium camembertii*).

5 CONCLUSÕES

A lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* sp CBMAI 1583 estudada neste trabalho apresentou atividade ótima em pH 4,0 e a 70 °C, tanto no filtrado de cultura quanto purificada. Essa enzima se mostrou peculiar, pois além de atuar em pH ácido, sua temperatura ótima é a mais elevada para lipases de fungos do gênero *Penicillium* descritas até o momento.

Em relação à estabilidade, essas duas preparações apresentaram perfis distintos. Por um lado, a enzima purificada se mostrou mais estável em relação ao pH, sendo possível verificar mais de 100 % de atividade após incubação por 24 h em diversos pH. Por outro lado, a enzima presente no filtrado de cultura se mostrou mais termoestável, com meias-vidas mais elevadas nas temperaturas de 50, 60 e 70 °C.

A lipase presente no filtrado de cultura foi inibida por agentes aniônicos, como SDS e deoxicolato de sódio, mas foi ativada por detergentes não iônicos nas concentrações de 1 e 5 %, como TX-100, Tween 20 e Tween 80.

Não foi possível purificar a atividade lipásica após duas etapas cromatográficas (cromatografia de interação hidrofóbica com octil Sepharose e cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-100), sendo detectada também atividade esterásica na amostra resultante. Porém, reduzindo-se a hidrofobicidade da resina utilizada na cromatografia de interação hidrofóbica (resina fenil Sepharose) uma adsorção mais seletiva foi alcançada, resultando em uma amostra purificada em uma única etapa, com recuperação de 80,8 % da atividade inicial e um fator de purificação de 516,1.

A massa molecular desta lipase foi estimada em 52,9 kDa através de SDS-PAGE e em 85,3 kDa através de cromatografia de exclusão molecular, o que sugere um comportamento dimérico da enzima em seu estado nativo.

Avaliando-se a estabilidade da lipase purificada frente a diversas substâncias é possível verificar que se trata de uma serino hidrolase, pois esta foi fortemente inibida por PMSF. Também é possível concluir que as interações hidrofóbicas entre os resíduos de aminoácidos são importantes para a manutenção de sua estrutura tridimensional, uma vez que nenhuma atividade foi detectada na presença de 10 mM de SDS. Além disso, foi possível observar que o equilíbrio entre as conformações aberta e fechada da lipase

purificada pode ser alterado pela adição de detergentes não iônicos, como Tween 20, Tween 80 e Triton X-100, os quais estimularam a atividade lipásica.

A presença de íons metálicos exerce efeitos na atividade enzimática da lipase de *Penicillium* sect. Gracilentia CBMAI 1583. Alguns íons apresentaram efeito positivo, estimulando a atividade enzimática (Mg^{2+} , Na^+ , NH_3^+ , Mn^{2+} e Pb^{2+}), enquanto outros inibiram a enzima (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} e Zn^{2+}).

A enzima se apresentou estável na maioria dos solventes avaliados, com destaque para n-hexano e iso-octano, os quais estimularam a atividade enzimática. Apenas na presença de n-butanol e xilol a enzima foi menos estável.

A lipase purificada seguiu o modelo cinético proposto por Michaelis-Menten, sendo que a presença de TX-100 não afetou significativamente a cinética enzimática.

A lipase purificada apresentou baixa especificidade, sendo capaz de hidrolisar ésteres de p-nitrofenila com cadeias carbônicas contendo de 10 a 18 carbonos. Máxima atividade enzimática foi observada com p-nitrofenil decanoato, sugerindo uma possível preferência por ésteres de cadeia mediana. Este resultado sugere que esta enzima seja boa candidata para aplicações em que diferentes tipos de lipídeos são encontrados, como, por exemplo, tratamento de efluentes.

As características verificadas até o momento são favoráveis para uma futura aplicação industrial desta enzima em processos que atuem em pH ácidos, como tratamentos de efluentes de indústrias de laticínios, resolução de ésteres na indústria farmacêutica ou adicionada em processos na indústria de alimentos. A estabilidade da lipase em solventes orgânicos também sugere que esta enzima seja uma candidata a atuar em síntese orgânica em reações em meios não aquosos.

Chapter 2

***Penicillium* sect Gracilentia CBMAI 1583 LIPASE IMMOBILIZATION BY DIFFERENT STRATEGIES, STABILIZATION AND CHARACTERIZATION OF DERIVATIVES**

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) are ubiquitous enzymes that catalyze the hydrolysis of ester bonds of triacylglycerol, operating at oil/water interface. These enzymes emerge in industrial processes, being used in the production of detergents, pulp and paper, dairy, cosmetics, among others. In spite of their excellent catalytic properties, the use of soluble enzymes in industrial processes is often costly and economically unviable, due to their disposal after use, poor stability and efficiency in various process conditions. Enzyme immobilization is an alternative, since it increases enzymatic efficiency, improves stability and is capable of reuse, besides allowing that only products are withdrawn in multiple steps processes. In this context, this work aimed to immobilize *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase by different strategies, characterize derivatives and apply them in the production of omega-3 fatty acids and ethyl esters. This lipase was immobilized in all six commercially available hydrophobic supports evaluated (butyl, phenyl and octyl Sepharose, Toyopearl Butyl 650 M, Lewatit VP OC 1600 and octadecyl Sepabeads[®]), with recovered activities over 50 % and a 1.5-fold factor increase in activity with octyl Sepharose. Phenyl was the most selective support for protein adsorption, being also a strategy for lipase purification. Octyl and phenyl derivatives were efficiently reused after 4 and 7 cycles, respectively, retaining around 50 % of initial activity. All hydrophobic derivatives were more stable to pH and temperature than mild CNBr derivative (taken as a model of lipase properties in absence of intermolecular phenomena). Stabilization factors around 40 were achieved with octyl and toyopearl butyl derivatives at 60 °C. The higher adsorption strength was observed in octadecyl Sepabeads[®] derivative: 5 % Triton X-100 was necessary to completely desorb lipase. Among hydrophobic supports, phenyl was the most active and selective derivative towards hydrolysis of fish oil, but CNBr derivatives were more selective, reaching a selectivity of 11.60 with mild CNBr derivative. In the ethanolysis, EE-EPA could be purely obtained with toyopearl butyl derivative in *tert*-amyl alcohol. In ionic adsorption, lipase was rapidly immobilized on anion exchangers, but it was not immobilized on cation exchangers. With CNBr derivatives, stabilization factors of 248.54 and 294.70 were reached at 60 °C, after 2 and 6 hours of immobilization, respectively. With glyoxyl agarose support, lipase was immobilized in pH 8.5 in absence of Triton X-100 but not in presence of this detergent.

Keywords: Adsorption. Covalent attachment. Fish oil hydrolysis. Fish oil ethanolysis. Omega-3. Bimolecular aggregates.

1 INTRODUCTION

Enzymes are mostly proteins able to accelerate a metabolic reaction through its power of catalysis, which is essential for the maintenance of life at a convenient time scale (NELSON e COX, 2014). Lipases (triacylglycerol acyl hydrolase, EC 3.1.1.3) constitute a class of enzymes that catalyze the hydrolysis of ester bonds of long chain triacylglycerol, with low solubility in water, which gives lipases the characteristic of catalysis at oil/water interface (GUPTA et al., 2003). These are ubiquitous enzymes; however, microbial lipases emerge in current industrial scenario due to its wide spectrum of application, which may be related to its diverse functions. In addition to hydrolysis of long chain triglycerides, in organic media these enzymes are capable of catalyzing the reverse reaction, esterifying fatty acids and glycerol into triglycerides, as well as acting on reactions of transesterification, alcoholysis and lactonization, among others (GOSH et al., 1996; REETZ, 2002).

Microbial lipases are widely used in industrial and biotechnological processes, since microorganisms are easy to handle, requires little storage space and produce large amounts of enzymes. However, the use of soluble enzymes at industrial scale is often costly and economically unviable, due to their disposal after use, poor stability and efficiency in various process conditions. Enzyme immobilization is an alternative to these issues, since it increases enzymatic efficiency, improves stability and is capable of reuse, besides allowing that only products are withdrawn in multiple steps processes (BRADY; JORDAAN, 2009). Besides, the use of an immobilized enzyme permits to greatly simplify the design of a reactor and control reactions, for example, one may stop the reaction by simply filtering the enzyme. Thus, immobilization is usually a requirement to the use of an enzyme as an industrial biocatalyst (MATEO et al, 2007).

Lipase immobilizations by adsorption on hydrophobic supports (like octyl-agarose and octadecyl Sepabeads[®]) or by ionic exchange (like monoaminoethyl-N-aminoethyl-agarose; MANAE-agarose) are widely used, since these are rapid, simple, low cost and highly selective methods. In addition, they allow reuse of enzymes and may be used as a strategy for purification as well as for immobilization (KURTOVIC et al., 2011; MENDES et al., 2011). Immobilization by covalent attachment to highly activated solid supports (such as glyoxyl-agarose), although is a laborious technique, is more efficient in terms of

stabilization. Through this method, enzyme tertiary structure is rigidified, leading to increased resistance to small conformational changes caused by pH, heat, organic solvents and denaturants agents. Since stabilization of enzymes is one of the major obstacles to industrial applications, the covalent attachment is a promising technique to fulfill this need (MENDES et al., 2011).

Immobilized lipases can be used for many purposes, but one important aspect is related to the obtainment of fatty acids of food industry interest, such as omega-3. Found mostly in animal oils, this compound can be obtained by the hydrolysis or alcoholysis of fish oils catalyzed by lipases, resulting as products free fatty acids and alcohol esters, respectively. Omega-3 is a physiologically essential nutrient required at different stages of life. In young ones, it is requested by the brain and the retina at high levels and it improves learning ability, mental development and visual acuity. In adults, it is considered to be beneficial in the prevention of cardiovascular diseases (MORENO-PÉREZ et al, 2014).

Illustrated the current scenario, this work is justified because the immobilization of a lipase produced by a new strain of *Penicillium*, isolated from soil of the Atlantic Rainforest, was studied in hydrophobic, ionic and covalent interactions with various supports, being evaluated important parameters such as reuse of derivatives, pH, temperature and organic solvents stability and the application of derivatives in the obtainment of omega-3 fatty acids and ethyl esters.

2 OBJECTIVES

2.1 General objectives

The main objectives of this work was to immobilize *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase by different strategies, characterize derivatives and use them in the production of omega-3 fatty acids and ethyl esters.

2.2 Specific objectives

- Immobilize *Penicillium* sect *Gracilentia* lipase on hydrophobic, ionic and covalent supports;
- Characterize immobilization derivatives on its ability to reuse; stability at different pH, temperature and organic media; and enzyme adsorption strength on hydrophobic supports;
- Perform the hydrolysis of fish oil in aqueous medium and ethanolsis of fish oil in organic media.

3 MATERIAL AND METHODS

3.1 *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583: strain, maintenance and lipase production

The *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 strain used in this work was isolated from Atlantic Rainforest soil, at Juréia-Itatins Ecological Station, São Paulo, Brazil (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). It is stored at two culture collections: the Culture Collection of the Environmental Studies Center (CEA), UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brazil; and the Brazilian Collection of Environmental and Industrial Microorganisms – CBMAI/CPQBA – UNICAMP, Paulínia, São Paulo, Brazil, under code CBMAI 1583. This strain was identified as a good lipase producer on previous screening for this enzyme (ALMEIDA, 2012) and its production was recently studied by Turati (2012).

Cultures were maintained on oat-agar slants (g L⁻¹: 30 oat, 20 agar) and periodically transferred to fresh tubes, grown at 28 °C for five days and stored at 4 °C. For lipase production, a submerged fermentation was performed. Five days-old conidia were suspended in sterile distilled water, with final concentration adjusted to 3 to 5 x 10⁷ conidia mL⁻¹ using a Neubauer's counting chamber. One milliliter of this suspension was inoculated into 125 mL Erlenmeyer's flasks containing 25 mL of Dheeman's et al. (2011) culture medium, modified as Turati (2012). Flasks were incubated at 28 °C, for three days, under 160 rpm orbital agitation. Cultures were vacuum filtrated, lyophilized and resulting powder was used as source of crude lipase.

3.2 Enzyme activity assay

Enzyme activity was measured by monitoring the increase in absorbance at 348 nm, produced by the release of p-nitrophenol (pNP) in the hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate (pNPP). The assay was performed using a spectrophotometer with a thermostated cell and continuous magnetic stirring (500 rpm), set to measure the absorbance every 1/50 second, during two minutes. To initialize the reaction, 0.1 mL of lipase solution or derivative suspension was added to 1.9 mL of substrate solution. Substrate solution was prepared by first dissolving 3.8 mg of pNPP in 0.5 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and then diluting to 0.5 mM with 25 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 containing 0.5 % Triton X-100 (TX-100). One unit of enzyme activity is defined as the amount of enzyme necessary to

release 1 μmol of pNP per minute under the above described conditions. Specific activity corresponds to the activity per gram of derivative. The molar extinction coefficient (ϵ) of pNP under the described conditions was 5,150, calculated from the standard curve.

3.3 Protein determination

Total protein in samples was determined by the bicinchoninic acid assay (PIERCE[®] Thermoscientific) according to manufacturer's instructions, using bovine serum albumin (BSA) as standard.

3.4 Lipase immobilization

Studies on immobilization of *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase by different strategies were performed: adsorption on hydrophobic and ionic supports and covalent attachment to glyoxyl agarose and bromo cyanogen (CNBr) activated Sepharose. In all cases, immobilization yield (Y) and recovered activity (RA) were calculated. Y was calculated according to formula 1:

$$\text{Immobilization yield (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (1),$$

in which A is the activity of the solution offered for immobilization and B is the activity of supernatant at the end of immobilization protocol. RA was calculated as it follows (formula 2):

$$\text{Recovered activity (\%)} = \frac{C}{A \cdot Y} \times 100 \quad (2),$$

in which C is the activity of immobilization derivative.

For all immobilization protocols, a lipase solution was prepared by suspending 10 mg of powder crude lipase in 1 mL of corresponding buffer, with a resulting protein concentration of 3.5 mg mL⁻¹.

Experiments were performed in duplicates and standard error never exceeded 5 %.

3.4.1 Adsorption on hydrophobic supports

Adsorption on six commercially available supports were studied, namely Butyl, Phenyl and Octyl Sepharose, Toyopearl Butyl 650 M, Lewatit VP OC 1600 and Octadecyl Sepabeads[®] (derivatives named as But, Phe, Oct, Toyo, Lew and Sepab, respectively). In all cases, supports were extensively washed with distilled water and vacuum filtrated prior to use.

For adsorption on hydrophobic surfaces, 9 mL of lipase solution in 5 mM phosphate buffer pH 7 were added to 1 g of support and the mixture was kept at room temperature and under mild stirring. Periodically, samples of suspension and supernatant were withdrawn and analyzed by the pNPP assay, described in section [2.2](#). A blank sample containing soluble lipase under the same experimental conditions was the control. After immobilization protocol, derivatives were vacuum filtrated with the aid of a sintered funnel, washed extensively with 5 mM phosphate buffer pH 7 and stored at 4 °C.

3.4.2 Adsorption on ion exchange supports

Ionic adsorption was studied on four supports: monoaminoethyl-N-aminoethyl (MANAE)-agarose, diethylaminoethyl (DEAE) Sepharose, carboxy methyl (CM) Sepharose and sulphopropyl (SP) Sepharose.

DEAE, CM and SP Sepharose were purchased from GE Healthcare and washed with abundant distilled water prior to use.

The support MANAE-agarose was prepared as proposed by Fernandez-Lafuente et al. (1993). First, agarose gel 6 BCL commercially available was extensively washed with distilled water. Then an activation step was performed, by the addition of more hydroxyl groups on agarose surface. For this purpose, 105 g of agarose gel were suspended in 30 mL of distilled water and mixed with 50 mL of sodium hydroxide (NaOH) 1.7 N and 1.425 g of sodium borohydride (NaBH_4), in ice cooled bath. To this blend, 36 mL of glycidol (2,3-epoxy-1-propanol) were slowly added and the mixture was stirred for 15h at room temperature. This activated agarose, with glyceryl groups on its surface, was vacuum filtrated and washed with distilled water. In order to obtain glyoxyl groups, for each gram of activated agarose, 2 mL of 100 mM sodium periodate (NaIO_4) solution and 8 mL of distilled water were added and kept under mild stirring for 90 minutes, at room temperature. From these glyoxyl groups, MANAE-agarose can be achieved by aminating the support. Thus, 35 g of glyoxyl gel were mixed with 200 mL of ethylenediamine 2 M pH 10 and stirred for 2 h. Two grams of NaBH_4 was then added and mixture was stirred for another 2 h. This reduction step with NaBH_4 allows: a complete conversion of Schiff's bases into stable secondary amine bonds; a complete reduction of possible remaining aldehyde groups; and a reduction of immobilized nitro compounds that could be formed by the oxidation of ethylenediamine at pH 10. MANAE-agarose gel was washed with NaCl

0,1 M to eliminate any ethylenediamine left and then with abundant distilled water, vacuum filtrated and stored at 4 °C.

With all ionic supports, immobilization protocol and derivatives storage were performed equally to adsorption on hydrophobic supports, described in section 3.4.1.

Adsorption on MANAE-agarose was also studied in presence of TX-100. Before being offered for immobilization, lipase solution was kept under mild stirring and room temperature for 30 minutes in presence of 0.5 and 1.5 % (w/v) of this detergent in 5 mM phosphate buffer pH 7.

3.4.3 Covalent attachment to CNBr-activated Sepharose

Dry commercially available CNBr-activated Sepharose (GE Healthcare) was swollen by suspension of each gram in 35 mL of HCl 0.1 M pH 2 for 45 minutes. Then, the swollen support was washed with the same acid solution in order to remove additives and filtrated by vacuum. With this freshly activated support, three immobilization protocols were performed:

- a) Mild CNBr: 4 mL of lipase solution in 5 mM phosphate buffer pH 7 were added to one gram of support, stirred at 4 °C for 15 min and vacuum filtrated;
- b) CNBr 2 h: 9 mL of lipase solution in 5 mM phosphate buffer pH 7 were added to one gram of support, stirred at 25 °C for 2 h and vacuum filtrated.
- c) CNBr 6 h: similar to b), but immobilization was performed for 6 h.

Time course of immobilization was followed by measuring lipase activity on supernatants and suspensions. A sample of soluble enzyme under the same experimental conditions was the control.

3.4.4 Multipoint covalent attachment to glyoxyl-agarose

Glyoxyl-agarose gel was prepared as proposed by Guisán (1988) and described in section 3.4.2, as it is a step in preparation of MANAE-agarose.

In general, immobilization protocols with this kind of support are carried out in bicarbonate buffer pH 10, followed by addition of NaBH₄ at the reaction end point. However, the catalytic properties of the lipase used in this study are affected by these conditions, so immobilization on glyoxyl-agarose was performed in sodium bicarbonate buffer 0.1 M pH 8.5 and without adding NaBH₄.

Four different conditions were studied in the case of immobilization on this support:

- a) At 4 °C;
- b) At 25 °C;
- c) At 25 °C in presence of 1.5 % of TX-100;
- d) And at 25 °C with a resin containing low concentration of glyoxyl groups.

For condition d), the support glyoxyl-agarose was prepared by just adding glyoxyl groups in agarose gel without the activation step.

For immobilization in conditions b and c, 9 mL of lipase solution were offered to one gram of support, while in conditions a and d, 4 mL of lipase solution were offered to one gram of support. From these circumstances, immobilization and storage were performed as described in section 3.4.1 for hydrophobic supports.

3.4.5 Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE)

In order to evaluate the selectivity of protein adsorption on hydrophobic supports a SDS-PAGE was performed, following the methodology described by Hames (1987). A 12 % polyacrylamide running gel and 5 % polyacrylamide stacking gel were used. Seventy milligrams of the immobilized enzyme samples were re-suspended in 100 μ L of rupture buffer (glycerol 27 %, SDS 6 %, β -mercaptoethanol 10 %, bromophenol blue 0.01 % in Tris-HCl buffer 0.12 M pH 6.8), boiled for 5 min and a 20 μ L aliquot of the supernatant was used in the experiments. Running buffer was composed of Tris 0.025 M, glycine 0.192 M and SDS 0.1 %, pH 8.3. For stacking and running gels, electric current was maintained in 70 V and 100 V, respectively. Gels were stained with silver, according to Blum et al. (1987). Low molecular weight markers from GE Healthcare were used (14.4 to 97 kDa).

3.5 Derivatives characterization

3.5.1 Derivatives reuse

Derivatives reuse was performed in falcon tubes, using a stopped method for activity assay. One milliliter of substrate solution (described in section 3.2) was added to 100 mg of derivative. After 1 minute of reaction, suspension was centrifuged for another minute at 5,000 rpm (centrifuga), supernatant was withdrawn and transferred to tubes containing 1 mL of sodium tetraborate saturated solution. The pNP formed was measured spectrophotometrically at 405 nm ($\epsilon = 1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Between each cycle derivatives

were washed with buffer, centrifuged and supernatant discarded. A new cycle was then initialized by addition of new substrate solution.

3.5.2 Stability in different pH in aqueous media

Derivatives were incubated in buffer 0.5 M glycine-HCl for pH 2.0 and 2.5; McIlvaine buffer for pH 3.0 to 8.0; 0.5 M Tris-HCl buffer for pH 8.5 and 9.0; and 0.5 M glycine-NaOH buffer for pH 9.5 and 10.0, with a 1:10 (w/v) proportion. The residual activity was measured after twenty four hours. Tests were performed under non-reactive conditions, at 25 °C and in duplicates.

3.5.3 Thermal stability

Thermal stability studies were carried out incubating the enzyme derivatives (1 g in 10 mL of 5 mM sodium phosphate buffer pH 7), at different temperatures. Samples of suspension were periodically withdrawn and their activity was measured using the pNPP assay. The residual activity was calculated as the ratio between the activity at a given time and the activity at time zero of incubation. The observed first order deactivation rate constant (K_d) and the half-life time ($T_{1/2}$) of derivatives on each temperature were calculated according to equations 3 and 4.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (3),$$

where: A is the derivative specific activity (U/g) at time t and A_0 is derivative specific activity at time zero;

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (4).$$

With these data, the stabilization factor (SF) was calculated by the ratio between derivative half-life and mild CNBr derivative half-life in a given temperature. As a model, mild CNBr was taken as comparison of lipase properties in absence of intermolecular phenomena.

3.5.4 Stability in different organic media

Octyl-agarose derivative stability in organic media was evaluated in the following substances: glycerol, ethanol, DMSO, acetonitrile, cyclohexane and *tert*-amyl alcohol. The derivative was incubated in the presence of each solvent in a concentration of 50 % (v/v) in

5 mM phosphate buffer pH 7, at 25 °C. After 2 h, samples of suspension were withdrawn and analyzed by pNPP assay for residual activity.

3.5.5 Lipase desorption from hydrophobic supports

In order to study adsorption strength of the enzyme on hydrophobic supports, growing concentrations of TX-100 were added to derivatives. One gram of immobilized lipase preparations was re-suspended in 10 mL of 5 mM sodium phosphate buffer pH 7, at 25 °C and the detergent was progressively added. The immobilized enzymes were incubated under gentle stirring for 30 min before measuring the enzyme activity in the supernatant. A reference with the soluble enzyme under the same experimental conditions was used to determine the effect of the detergent on the enzyme activity.

3.6 Lipase application in the production of omega-3 fatty acids and ethyl esters

3.6.1 Fish oil hydrolysis in aqueous media

Fish oil hydrolysis was performed with But, Phe, Oct and CNBr derivatives and with the soluble free enzyme, in presence of cyclohexane, as proposed by Fernández-Lorente et al. (2011).

The fish oil used in this work was sardine oil, obtained from BTSA, Biotecnologías Aplicadas, S.L. (Madrid, Spain). This oil is composed of triacylglycerol formed by 18 % eicosapentaenoic acid (EPA) and 12 % docosahexaenoic acid (DHA).

The hydrolysis of fish oil was performed in an organic/aqueous biphasic system. The procedure was as follows: 2.25 mL of cyclohexane, 2.5 mL of McIlvaine buffer pH 5, and 0.25 mL of fish oil were placed in a reactor and pre-incubated at 45 °C for 30 min; the reaction was then initialized by adding 0.3 g of derivative and stirred at 150 rpm. The concentration of free fatty acids in the organic phase was determined by RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 coupled with a UV detector SpectraPhysic SP 8450) using a reversed-phase column (Ultrabase C18, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm particle). Products were eluted at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ with acetonitrile/water/acetic acid (70:30:0.1, v/v) pH 3. The UV detection was performed at 215 nm. The retention times (RT) for the polyunsaturated fatty acids (PUFA) were 18 min for EPA and 24 min for DHA. These enzymatically produced PUFA were compared to their corresponding pure commercial standards and yields could be easily calculated from the peak areas.

3.6.2 Fish oil ethanolysis in organic media

Fish oil ethanolysis was performed with Toyo, Lew and Sepab, in presence of cyclohexane, *tert*-amyl alcohol and in absence of solvents, as proposed by Moreno-Pérez et al. (2014).

First, the derivatives were dried by lyophilization. Then, to initialize the enzymatic synthesis of omega-3 fatty acids ethyl esters, 0.3 g of dried derivative was added to substrate solution. In case of reaction in presence of solvents, substrate solution was composed of 0.59 mL of sardine oil, 0.3 mL of ethanol, 4.11 mL of cyclohexane or *tert*-amyl alcohol and 0.2 g of molecular sieves, with a 1:10 molar ratio ethanol : fish oil and a final concentration of 125 mM of fish oil. In case of reaction in absence of solvents, substrate solution was composed of 1.77 mL of fish oil, 1.17 mL of ethanol and 0.2 g of molecular sieves, being the molar ratio maintained and the oil final concentration being 701 mM. The reaction was carried out in anhydrous system, at 45 °C, under mild stirring and it was followed by RP-HPLC analysis.

Reactants and products were analyzed by RP-HPLC (Spectra Physic SP 100 coupled with a UV detector SpectraPhysic SP 8450) using a reversed-phase column (Ultrabase C18, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 5 µm particle). Products were eluted at a flow rate of 1.0 ml min⁻¹ with acetonitrile/water/acetic acid (80:20:0.1, v/v) pH 3. The UV detection was performed at 215 nm. At this wavelength, synthetic yields could be easily calculated from the pure peak areas corresponding to ethyl ester of eicosapentaenoic acid (EE-EPA; RT of 24 min) and ethyl ester of docosahexaenoic acid (EE-DHA; RT of 28 min).

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Hydrophobic derivatives

4.1.1 Immobilization

The immobilization of lipases on hydrophobic supports at low ionic strength is a very simple and efficient method to immobilize, purify and stabilize these enzymes. In this kind of immobilization, lipases are adsorbed via interfacial activation, where the hydrophobic surroundings of their active center, that is the internal face of the lid, interact with the hydrophobic moieties of the support, fixing their open conformation (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2007). The adsorption is strong enough to use lipases derivatives as immobilized enzymes, although it may be desorbed by detergents (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008).

In this work, *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase was immobilized via hydrophobic interactions on butyl-, phenyl- and octyl- Sepharose, Toyopearl Butyl 650 M, Lewatit VP OC 1600 and Octadecyl Sepabeads[®]. The results are shown in **Table 1**.

Table 1 - Immobilization parameters of *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase on hydrophobic supports.

Derivative	Immobilization	Recovered	Specific activity (U/g)
	Yield (%)	Activity (%)	
Butyl Sepharose	90.06	78.90	5.14
Phenyl Sepharose	77.25	87.86	4.66
Octyl Sepharose	71.44	144.85	20.87
Toyopearl Butyl 650 M	90.29	73.59	3.73
Lewatit VPOC 1600	76.82	54.22	3.64
Octadecyl Sepabeads [®]	82.05	81.51	3.54

Activities were measured by the pNPP assay, described in section 3.2. The activity of soluble lipase offered for immobilization was considered 100 %. Parameters were calculated as described in section 3.4.

The lipase studied was able to be immobilized in all six hydrophobic supports tested. Immobilization protocols were performed until activity in supernatant was

stabilized, being 90 minutes for But, Phe and Oct and 120 minutes for Toyo, Lew and Sepab. Only in the case of Oct the effect of lipase immobilization on its activity against pNPP was positive, with an increased activity of almost 1.5-fold factor. Although no activation was observed with other supports, the immobilization yields and recovered activities were high in all cases, always above 50 %. This behavior was also observed by Cunha et al. (2008), who have not detected hyperactivation for *Yarrowia lipolytica* lipase adsorbed on hydrophobic supports either, with recovered activities of 34 and 59 % on octyl agarose and octadecyl Sepabeads[®], respectively.

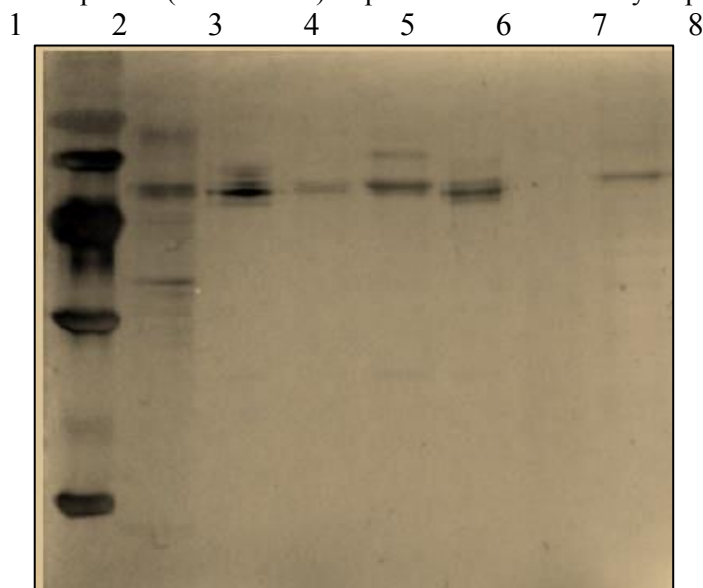
Fernández-Lorente et al. (2008) compared the immobilization of four commercial lipases (lipase B from *Candida antarctica*, CAL-B; lipase from *Thermomyces lanuginose*, TLL; lipase from *Bacillus thermocatenuatus*, BTL; and a phospholipase, Lecitase[®] Ultra) on different agarose based supports and toyopearl supports. Their results showed that the selection of different supports yielded very different results in terms of recovered activity, ranging from a seven-fold hyperactivation with TLL adsorbed on octyl-agarose, to 50 % of recovering with Lecitase adsorbed on Toyopearl Butyl. As well as in this study, octyl-agarose afforded the highest activities for all four enzymes tested.

Those results might be related with the close contact between the enzyme active center and the support, so changes in the internal morphology or in the groups coating the support may greatly alter the enzyme properties. Agarose beads are hydrophilic structures formed by cross linked wide trunks, offering an almost planar surface for enzyme interaction when compared to lipase size. Toyopearl is a support made of acrylic material and formed by thin crossed fibers that might be even smaller than lipase molecules, with a certain hydrophobic character. Lewatit and Sepabeads[®] are macroporous cross linked methacrylate polymers, which might allocate lipases inside their structure (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008; NO et al., 2013). Moreover, the hydrophobic character of each matrix may be reinforced by coating the fibers surface with different groups, such as butyl, phenyl or octyl. Therefore, the interaction of the same lipase with different supports may provide different immobilization parameters and produce catalysts with different characteristics.

Besides the advantages of using immobilized enzymes, such as reusability, hyperactivation and stabilization, selective adsorption on hydrophobic supports may be used to purify enzymes preparations. As crude lipase from *Penicillium* sect *Gracilenta*

CBMAI 1583 was offered for immobilization, the proteins adsorbed on all supports were compared and the results are shown in **Figure 1**.

Figure 1 - Electrophoretic profile (SDS-PAGE) of proteins adsorbed on hydrophobic supports.



Lane 1: standard molecular weights (from top to bottom: phosphorilase b, 97 kDa; albumin, 66 kDa; ovalbumin, 45 kDa; carbonic anhydrase, 30 kDa; trypsin inhibitor, 20.1 kDa; α -lactalbumin, 14.4 kDa). Lane 2: crude lipase. Lane 3: Butyl Sepharose derivative. Lane 4: Phenyl Sepharose derivative. Lane 5: Octyl Sepharose derivative. Lane 6: Toyopearl Butyl 650 M derivative. Lane 7: Lewatit VPOC 1600 derivative. Lane 8: Octadecyl Sepabeads® derivative.

In all cases lipase purification was very high just during the adsorption step, removing a significant number of proteins when compared to lane 2. The most selective support for lipase adsorption was Phe (lane 4), in which just one protein band can be visualized. In this way, lipase from *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 produced under the described conditions may be purified in a single step, using the Phenyl Sepharose resin.

4.1.2 Characterization

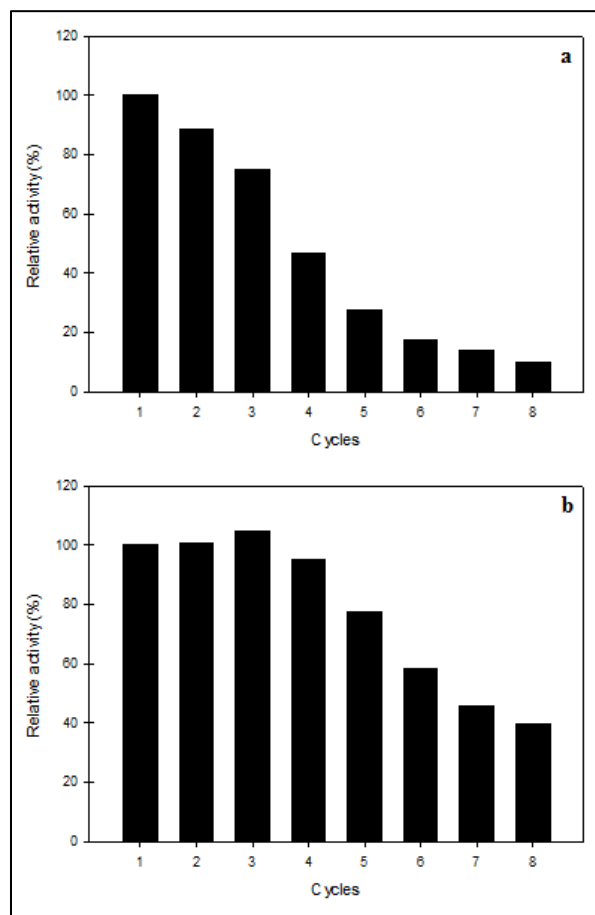
4.1.2.1 Derivatives reuse

The use of soluble enzymes at industrial scale is often costly and economically unviable, due to their disposal after use and poor stability and efficiency in various process conditions. Enzyme immobilization is an alternative to these issues, since it increases enzymatic efficiency, improves stability and is capable of reuse, besides allowing that only products are withdrawn in multiple steps processes (BRADY; JORDAAN, 2009). The

reuse of a biocatalyst constitutes the main advantage of enzyme immobilization and is an important parameter for repeated applications in batch reactors or for continuous use.

In order to evaluate the reusability of immobilized *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase towards the hydrolysis of pNPP, oct and phe derivatives were submitted to repeated cycles of activity assay. Results are shown in **Figure 2**.

Figure 2 – Reuse of (a) octyl and (b) phenyl derivatives towards pNPP hydrolysis.



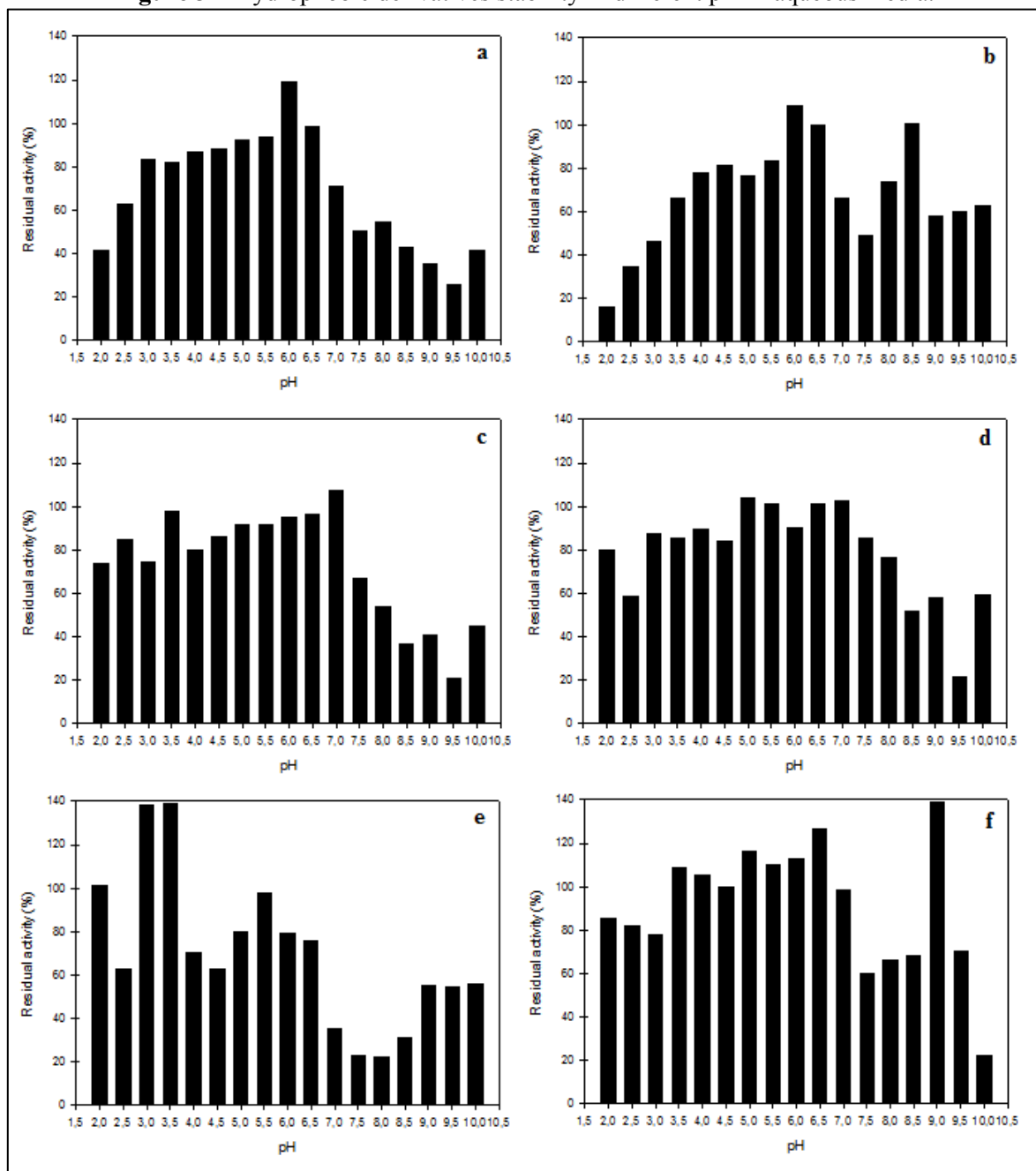
Oct derivative showed a pronounced decrease in relative activity after each cycle. However, more than 50 % of initial activity was retained after four cycles. In the case of phe derivative, the loss in activity after each cycle was less evident, with almost 100 % of initial activity retained after the fourth cycle. Phe derivative even maintained around 50 % of initial activity after 7 cycles. This observed decrease in activity after each cycle may be due to lipase release from the surface of supports. The multiple washing and separation of derivatives steps employed and the fact that substrate solution contains 0.5 % of TX-100 must have collaborated to enzyme desorption, since it is only attached by weak interactions.

In literature, results for the reuse of immobilized lipases are very diverse. Fadiloglu et al. (1998) observed just 11 % of initial activity after 3 cycles with *Candida rugosa* lipase immobilized on celite, while Cabrera-Padilla et al. (2012) found that lipase from this same microorganism immobilized on poly (3-hydroxybutyrate-co-ydroxyvalerate) could be reused up to 12 cycles, maintaining 50 % of its initial activity. Therefore, derivatives reuse is modulated not only by the kind of support employed but also by the lipase used and the assay conditions.

4.1.2.2 Stability in different pH in aqueous media

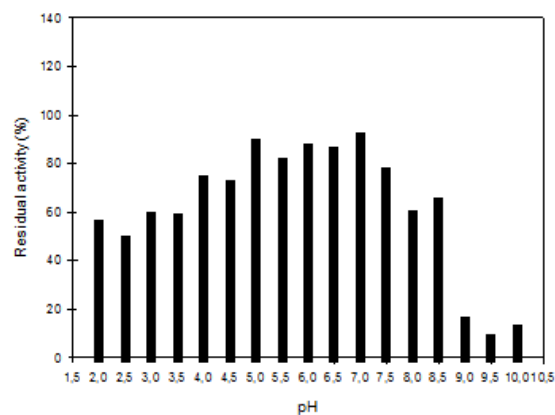
The pH medium has great influence on enzymatic activity, since it interferes in the net electric charge of the protein, modifying the electrostatic forces that stabilize protein structure (NELSON; COX, 2014). Knowing the stability of enzymes and of their immobilization derivatives in different pH is important to design reactions in which most advantages can be taken of.

The pH stability of all six hydrophobic derivatives was evaluated and results are displayed in **Figure 3**. **Figure 4** shows the pH stability of mild CNBr derivative, taken as reference of lipase properties in absence of intermolecular phenomena.

Figure 3 – Hydrophobic derivatives stability in different pH in aqueous media.

(a) Butyl Sepharose; (b) Phenyl Sepharose; (c) Octyl Sepharose; (d) Toyopearl Butyl 650 M; (e) Lewatit VP OC 1600; (f) Octadecyl Sepabeads[®]. Derivatives were incubated for 24 h at 25 °C, in buffers: 0.5 M glycine-HCl for pH 2.0 and 2.5; McIlvaine buffer for pH 3.0 to 8.0; 0.5 M Tris-HCl buffer for pH 8.5 and 9.0; and 0.5 M glycine-NaOH buffer for pH 9.5 and 10.0, with a 1:10 (w/v) proportion.

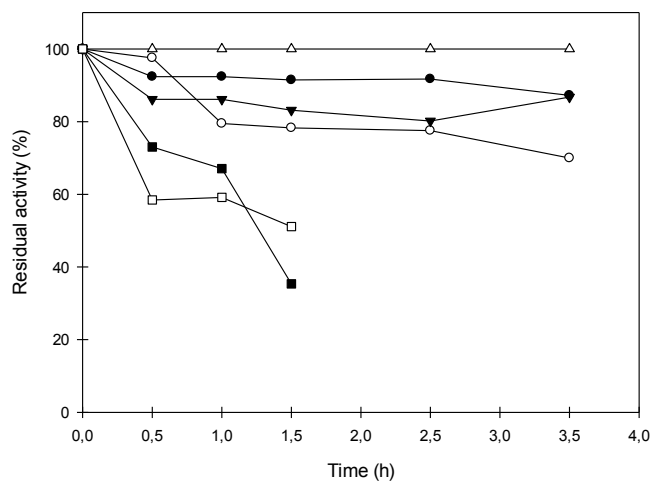
Figure 4 – Mild CNBr derivative stability in different pH in aqueous media.



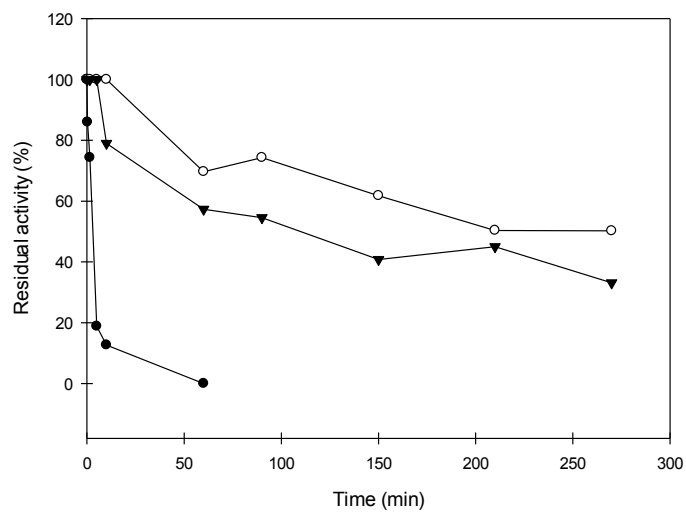
In general, all derivatives presented higher stability in acidic-neutral pH and lower residual activity on alkaline pH, the same behavior observed for mild CNBr. As an exception, phe presented lower stability on acidic pH and higher stability on alkaline pH. The most stable derivative towards pH was Sepab, which preserved more than 50 % of initial activity in all pH but 10.0. Also, all derivatives were more stable than mild CNBr.

4.1.2.3 Thermal stability

Thermal stability studies of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase immobilized on hydrophobic supports were performed in 5 mM sodium phosphate buffer pH 7 by incubating derivatives at 50, 60 and 70 °C. As can be observed in **Figures 5, 6 and 7** the increase of incubation temperature led to increased inactivation rate of the biocatalyst prepared, as expected.

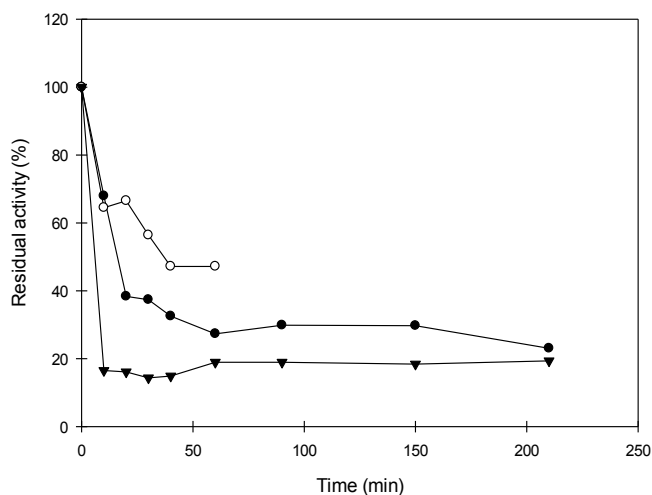
Figure 5 – Hydrophobic derivatives thermal stability at 50 °C.

Incubation was carried out in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7, under non-reactive conditions. (●) Butyl; (○) Phenyl; (▼) Octyl; (Δ) Toyopearl Butyl; (■) Lewatit; (□) Octadecyl Sepabeads.

Figure 6 – Octyl, Toyopearl Butyl and mild CNBr derivatives thermal stability at 60 °C.

Incubation was carried out in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7, under non-reactive conditions. (●) Mild CNBr; (▼) Octyl; (○) Toyopearl Butyl.

Figure 7 – Butyl, Phenyl and Octyl derivatives thermal stability at 70 °C.



Incubation was carried out in 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7, under non-reactive conditions. (●)Butyl; (○)Phenyl; (▼)Octyl.

At 50 °C, But, Phe, Oct and Toyo derivatives were quite stable, retaining more than 70 % of initial activities after 3.5 h of incubation. The derivatives Lew and Sepab were the less stable at this temperature, showing half-lives of 78.15 and 46.52 min, respectively (**Table 2**).

At 60 °C, Toyo was more stable than Oct, and both were more stable than mild CNBr. High stabilization factors were achieved: 46.25 for Toyo and 30.78 for Oct; thus, immobilization by adsorption on hydrophobic supports showed to be a successful alternative for *Penicillium* sect Gracilentia CBMAI 1583 stabilization. These results are better than others previously reported in literature, such as Miranda et al. (2014) and Prlainovic et al. (2011) that observed SF of around 2 for TLL immobilized on poly-hydroxybutyrate particles and CRL immobilized on Sepabeads®.

At 70 °C, But, Phe and Oct derivatives showed the same profile, first with a steep decay in residual activity, followed by a stabilization of residual activity. At this temperature, Phe was the most stable derivative, with half-life of almost 37 min.

Table 2 - Kinetic parameters of hydrophobic derivatives thermal stability.

Derivative	Parameter	Temperature (°C)			SF
		50	60	70	
Butyl Sepharose	K _d	0.0006		0.0984	-
	T _(1/2)	18.05 h	NM	7.05 min	
Phenyl Sepharose	K _d	0.0017		0.0187	-
	T _(1/2)	6.05 h	NM	36.92 min	
Octyl Sepharose	K _d	0.0011	0.0067	0.1801	30.78
	T _(1/2)	9.74 h	103.45 min	3.84 min	
Toyopearl Butyl 650M	K _d	0.0004	0.0045		46.25
	T _(1/2)	25.11 h	155.41 min	NM	
Lewatit VP OC 1600	K _d	0.0088			-
	T _(1/2)	78.15 min		NM	
Octadecyl Sepabeads®	K _d	0.0149			-
	T _(1/2)	46.52 min		NM	
Mild CNBr	K _d		0.2060		-
	T _(1/2)	NM	3.36 min	NM	

K_d – Deactivation constant (min⁻¹); T_(1/2) – derivative half-life; NM – not measured; SF – stabilization factor at 60 °C.

4.1.2.4 Stability in different organic media

Lipases are ubiquitous enzymes; however, microbial lipases emerge in current industrial scenario due to its wide spectrum of application, which may be related to its diverse functions. In addition to hydrolysis of long chain triglycerides, in organic media

these enzymes are capable of catalyzing the reverse reaction, esterifying fatty acids and glycerol into triglycerides, as well as acting on reactions as transesterification, alcoholysis and lactonization, among others (GOSH et al., 1996; REETZ, 2002). In this sense, lipases present great interest in organic chemistry, so evaluating their stability in different organic media is essential for designing a reaction.

In this work, octyl derivative was incubated with glycerol, DMSO, acetonitrile, ethanol, *tert*-amyl alcohol and cyclohexane, being the residual activity measured after 2 h. In **Table 3**, results are displayed and solvents are presented according to their hydrophobicity, meaning that the higher is the logarithm of the partition coefficient of a particular solvent (*Log P*) the more hydrophobic it is (SANGSTER, 1989).

Table 3 – Octyl derivative stability in different organic media.

Solvent	Log <i>P</i>	Residual activity (%)
Glycerol	-1.67	93.11
DMSO	-1.35	41.90
Acetonitrile	-0.34	0.00
Ethanol	-0.30	0.00
<i>Tert</i> -amyl alcohol	0.89	0.00
Cyclohexane	3.44	48.79

Octyl derivative was incubated in 50 % (v/v) solvent/ sodium phosphate buffer 5 mM pH 7, at 25 °C, for 2 h, under non-reactive conditions. Log *P*: logarithm of the partition coefficient of a particular solvent between n-octanol and water.

The derivative evaluated was stable in glycerol, retaining more than 93 % of initial activity after incubation. The other solvents presented negative effect on derivative stability, with almost 50 % of residual activity with DMSO and cyclohexane, and none residual activity with acetonitrile, ethanol and *tert*-amyl alcohol.

In general, polar miscible water solvents are more destabilizing than hydrophobic immiscible solvents, but lipases present different stabilities towards different solvents. It is suggested that non-polar solvents may promote changes in the equilibrium between open and closed conformations of lipases, as well as modify substrates and products solubility; while polar solvents may remove the enzyme water solvation (CASTRO-OCHOA et al.,

2005). In this study, no pattern between Log P and derivative stability could be observed, with stability being more related to the chemical nature of the solvent than to its hydrophobicity or hydrophilicity.

4.1.2.5 Lipase desorption from hydrophobic supports

It was observed that the support used for immobilization modulates the derivative catalytic properties and stabilities. In this sense, lipase adsorption strength on the different hydrophobic supports tested was also studied. Derivatives were incubated in growing concentrations of TX-100 and the amount necessary to release 100 % of the adsorbed lipase was taken as a measure of the adsorption strength (**Table 4**).

Table 4 - Amount of Triton X-100 necessary to fully release lipase adsorbed on different hydrophobic supports.

Derivative	Triton X-100 (%)
Butyl Sepharose	0.15
Phenyl Sepharose	0.20
Octyl Sepharose	0.20
Toyopearl Butyl 650 M	0.20
Lewatit VP OC 1600	1.00
Octadecyl Sepabeads®	5.00

The support that required the highest amount of detergent to completely desorb lipase was octadecyl Sepabeads®. This may be due to its morphology and hydrophobicity, since it is a macroporous acrylic support that can allocate the lipase inside its structure and its functional group is composed of an alkyl chain of 18 carbons, being the most hydrophobic support used and so the one that lipase adsorption strength is higher. Lew derivatives also required great amount of TX-100 to desorb lipase as it is also a macroporous support, functionalized with octyl groups.

The derivatives But, Phe, Oct and Toyo required similar amounts of detergent. In the case of agarose based supports the lower concentrations of TX-100 required may be related to the large surface offered by their structure for interaction, what reduces the geometrical congruence concerning the lid, the active center and the hydrophobic groups of the supports

(FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2008). In the case of toyo derivative, it was expected that higher amounts of detergent would have been necessary to release adsorbed lipase in comparison with agarose derivatives, as observed by Fernández-Lorente (2008) for BTL, TLL and Lecitase. Because toyopearl is composed of thin acrylic fibers, it may be assumed that there are more geometrical congruence between enzyme and support, what would lead to higher adsorption strength. Nevertheless, in this same study 0.2 % of TX-100 was the concentration detected to desorb CAL-B from octyl Sepharose and from Toyopearl Butyl. The results observed in the cited and in the present studies suggest that adsorption strength is determined not only by the structure and hydrophobicity of the support but also by lipases features, such as size of the lid and hydrophobic residues number.

4.1.3 Hydrolysis of fish oil in aqueous media

Immobilized lipases can be used for many purposes, but one important aspect is related to the obtainment of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of food industry interest, such as omega-3. Found mostly in marine animal's oils (mainly consisting of DHA and EPA), these PUFA can be enzymatically obtained by the hydrolysis or alcoholysis of fish oils catalyzed by lipases, resulting as products free fatty acids and alcohol esters, respectively (MORENO-PÉREZ et al., 2014).

Omega-3 fatty acids play a significant role in human health, being physiologically essential nutrients required at different stages of life. In young ones, DHA is requested by the brain and the retina at high levels and it improves learning ability, mental development and visual acuity. In adults, EPA is considered to be beneficial in the prevention of cardiovascular diseases (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011a). Triglycerides enriched in either or both DHA and EPA could be very interesting when used to promote different health effects, raising an important market for dietary supplements and nutraceuticals that contain these PUFA (PIZARRO et al., 2012).

In the present study, three hydrophobic derivatives (but, phe and oct) were used for the release of EPA and DHA omega-3 fatty acids from hydrolysis of sardine oil. As proposed by Fernández-Lorente et al. (2011b), a biphasic system water-immiscible cosolvent (cyclohexane) was used in order to make oil manipulation feasible, especially at low oil concentration. In this case, lipase inside the porous of supports could only hydrolyze the oil molecules partitioned in the aqueous phase of the system.

The results were compared to lipase immobilized on CNBr agarose under mild conditions (mild CNBr) and are shown in **Table 5**.

Table 5 – Parameters of fish oil hydrolysis with hydrophobic and mild CNBr derivatives.

Derivative	Initial Activity ^a	Selectivity ^b
Octyl-Sepharose	0.073	2.27
Butyl-Sepharose	0.032	3.47
Phenyl-Sepharose	0.093	5.68
Mild CNBr-agarose	0.055	11.60

Reaction was carried out in an aqueous/organic biphasic system, with McIlvaine buffer pH 5,0/cyclohexane, at 45 °C and 150 rpm.

^aInitial activity is expressed as μmol of hydrolyzed PUFA (EPA + DHA) per minute and per gram of immobilized enzyme.

^bSelectivity is expressed as the ratio between % of hydrolyzed EPA and % of hydrolyzed DHA. All parameters were calculated after 24h of reaction.

The most active derivative was phenyl, releasing 0.093 μmol of PUFA per minute of reaction and per gram of immobilized enzyme. Butyl was the least active derivative, releasing almost a 3 times less PUFA than phe (0,032 μmol of PUFA released per minute of reaction and per gram of immobilized enzyme). These results are comparable to those reported in literature in the hydrolysis of fish oil under the same experimental conditions and for lipases adsorbed on hydrophobic supports. When adsorbed on the same supports, derivatives of *Penicillium* sect Gracilentia CBMAI 1583 immobilized lipase were as active as commercial lipases (CALB and TLL) and *Hypocrea pseudokoningii* lipase (**Table 6**) (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2011b; PEREIRA et al., 2015).

Table 6 – Hydrolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases on hydrophobic supports.

Lipase	Support	Initial activity ^a	Reference
CALB	Octyl-Sepharose	0.104	FERNANDEZ-LORENTE
TLL		0.060	et al., 2012
<i>Penicillium</i> sect Gracilentia CBMAI 1583	Octyl-Sepharose	0.073	This work
<i>Hypocrea pseudokoningii</i>	Butyl-Sepharose	0.030	PEREIRA et al., 2015
<i>Penicillium</i> sect Gracilentia CBMAI 1583	Butyl-Sepharose	0.032	This work

CAL-B: *Candida antarctica* lipase, fraction B; TLL: *Thermomyces lanuginosa* lipase.

^aInitial activity is expressed as μmol of hydrolyzed PUFA (EPA + DHA) per minute and per gram of immobilized enzyme.

Considering the above described conditions, *Penicillium* sect Gracilentia CBMAI 1583 lipase immobilized in hydrophobic supports was able to catalyze the hydrolysis of fish oil and so release EPA and DHA omega-3 fatty acids. In order to improve derivatives activity towards fish oil hydrolysis some future studies could be developed, such as: improvement of the solubilization of triglycerides into the aqueous phase; optimization of reaction conditions; lipase heterologous expression, aiming to produce higher amounts of enzyme; and work with purified lipase preparations, so that derivatives with higher specific activities could be obtained.

Table 5 also shows derivatives selectivity towards hydrolysis of EPA and DHA. All derivatives hydrolyzed EPA with a higher rate than hydrolyzed DHA (selectivity > 1). Consistently with other studies (**Table 7**), this may be explained by the steric hindrance of DHA molecule produced by multiple folds in cis-type unsaturations along its hydrocarbon chain. In addition, DHA is commonly esterified in the *sn*-2 position of triglycerides, making it difficult for the lipase to reach the ester bond (PIZZARO et al., 2012). Among hydrophobic derivatives, phenyl was the most selective one; however, mild CNBr derivative was more selective than hydrophobic ones. Hydrophobic derivatives could be very useful in obtaining mixtures of EPA and DHA from sardine oil hydrolysis, while mild CNBr derivative could be used to enrich EPA contents in fish oils.

Table 7 - Ratio between the release of EPA versus the release of DHA during the first stages of the hydrolysis of sardine oil catalyzed by lipases immobilized on Octyl-Sepharose.

Lipase	Selectivity ^a	Reference
CAL-B	1.50	
RML	4.47	Fernández-Lorente et al. (2011b)
TLL	4.45	
CCL	1.43	Pizarro et al. (2012)
<i>Penicillium</i> sect Gracilenta CBMAI 1583	2.27	This work

^aSelectivity is expressed as the ratio between % of hydrolyzed EPA and % of hydrolyzed DHA.

4.1.4 Ethanolysis of fish oil in organic media

Ethanolysis is the reaction that converts triacylglycerol into ethyl esters and glycerol, in presence of ethanol in organic medium. Ethanolysis of fish oil promotes the synthesis of ethyl esters containing omega-3 fatty acids, which are of currently interest in food industry. Enzymatically synthesis of ethyl esters is attractive compared to chemical reactions, since processes can be executed under mild conditions avoiding the formation of undesirable byproducts (MORENO-PEREZ et al., 2014).

In this work, ethanolysis of sardine oil was performed only with Sepab, Lew and Toyo derivatives, because their acrylic structure allows derivatives to be dried. The raise in the water content favors hydrolysis over synthesis. Thus, to ensure the synthetic yield, very low contents of water were maintained, by using dried derivatives and adding molecular sieves to reactors. The reaction was performed with and without solvents; although organic solvents facilitate the handle of oils and may modulate and improve the activity-selectivity properties of the different derivatives, they may be toxic and contaminate products. The results of fish oil ethanolysis catalyzed by *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase derivatives are displayed in **Table 8**.

Table 8 - Parameters of fish oil ethanolsis with hydrophobic derivatives.

Solvent	Derivative	Initial Activity^a	Selectivity^b
	Octadecyl Sepabeads [®]	0.020	2.20
<i>Tert</i> -amyl alcohol	Lewatit VPOC 1600	0.988	2.07
	Toyopearl Butyl	0.017	-
	Octadecyl Sepabeads [®]	0.012	1.97
Cyclohexane	Lewatit VPOC 1600	0.189	1.93
	Toyopearl Butyl	-	-
	Octadecyl Sepabeads [®]	0.130	2.82
Without solvent	Lewatit VPOC 1600	0.172	2.31
	Toyopearl Butyl	0.074	1.44

Reaction was carried out in anhydrous system at 45 °C and mild stirring.

^aInitial activity is expressed as μmol of ethyl esters of PUFA (EE-EPA + EE-DHA) synthesized per hour and per mg of immobilized protein.

^bSelectivity is expressed as the ratio between % of synthesized EE-EPA and % of synthesized EE-DHA.

All parameters were calculated after 24h of reaction.

Lew was the most active derivative in all conditions tested, being more active when ethanolsis was performed in *tert*-amyl alcohol. The activity observed with this derivative in cyclohexane was similar to the one in absence of solvents; however the discrimination between EE-EPA and EE-DHA was slightly higher without solvents. In terms of activity Sepab and Toyo presented an opposite behavior, being more active without solvents. Toyo was not able to synthesize ethyl esters at all in presence of cyclohexane. Nevertheless, in terms of selectivity, Sepab was more selective without solvents while Toyo was more selective in *tert*-amyl alcohol, situation in which only EE-EPA could be detected.

Moreno-Perez et al. (2014) performed the selective ethanolysis of fish oil with CAL-B, TLL and RML adsorbed on Octadecyl Sepabeads[®], in cyclohexane and in *tert*-amyl alcohol. Their activities were higher (0.0736 μmol of ethyl ester of PUFA synthesized per minute and per mg of immobilized lipase for CAL-B in cyclohexane, for example), because of high loaded derivatives and use of purified preparations. In terms of selectivity, discrimination between EE-EPA and EE-DHA varied from 1 to 29. The results observed in both works confirm that selective ethanolysis depends on type of enzyme, support and solvent used.

In this case, ethanolysis performed with Lew in *tert*-amyl alcohol could be useful for ethyl esters synthesis and EE-EPA could be purely obtained from ethanolysis with Toyo in *tert*-amyl alcohol.

4.2 Ion exchange derivatives

One common and easy protocol to perform reversible immobilization of enzymes with an easy regeneration of the support is the ionic adsorption (MENDES et al., 2011). In this kind of immobilization, enzymes may be immobilized via their amino or carboxy terminal groups, depending on the functional group added to the support. In addition, immobilization may occur by other charged residues, like Asp and Glu, for example, that usually constitute the major fractions of surface groups in proteins, allowing immobilization via very simple coupling methods (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1993).

Several supports are available for this purpose. MANAE agarose and DEAE Sepharose are anion exchanger resins, with amino groups added to agarose. In this way, they are capable of immobilizing enzymes via their carboxy terminal group or via negatively charged residues in a particular pH. On the other hand, CM and SP Sepharose are cation exchanger resins, with carboxymethyl and sulphopropyl groups linked to agarose, respectively. Thus, they are capable of immobilizing enzymes via their amino terminal group or via positively charged residues in a given pH.

Penicillium sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase immobilization on ionic supports was studied and results are shown in **Table 9**.

Table 9 - Immobilization parameters of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase on ion exchange supports.

Derivative	Immobilization Yield (%)	Recovered Activity (%)	Specific activity (U/g)
MANAE Agarose	74.62	0.00	0.00
MANAE Agarose 0.5 % TX-100*	90.38	0.00	0.00
MANAE Agarose 1.5 % TX-100*	99.17	0.00	0.00
DEAE Sepharose	99.25	0.00	0.00
CM Sepharose	0.00	0.00	0.00
SP Sepharose	0.00	0.00	0.00

*TX-100 was added to lipase preparation prior to immobilization protocol.

Lipase immobilization was possible only with anion exchanger supports, with high immobilization yields being achieved in less than 15 minutes (data not shown) in all conditions tested. However, no activity could be recovered in the derivative, which may be related to enzyme distortion during immobilization. The negatively charged groups of this enzyme at pH 7 may be important for the maintenance of protein structure and their involvement in immobilization may have caused distortion of the active center.

In the case of cation exchanger supports, all activity remained in the supernatant even after 24 h, indicating that this lipase has a negative net electric charge at pH 7, causing an electrostatic repulsion with the supports.

Ionic adsorption on MANAE agarose was also studied in presence of TX-100, aiming to recover activity in suspension, since the active site would be occupied and protect by the detergent. Growing concentrations of TX-100 improved immobilization yields, but yet no activity was recovered.

4.3 CNBr activated agarose derivatives

4.3.1 Immobilization

CNBr activated Sepharose support is able to immobilize enzymes by one very stable bond through the terminal amine group, which has a pK around 7–8 making possible to

perform immobilization under mild conditions (MATEO et al., 2005). Therefore, this kind of immobilization allows producing derivatives to be used as a reference for enzyme behavior, as it constitute a good model of the enzyme properties in absence of intermolecular phenomena (LIMA et al., 2013). However, multipoint covalent attachment may be established with cyanogen bromide supports, if the enzyme has reactive amino groups placed on its surface, such as lysine residues. Nevertheless, proteins should be mainly immobilized via the amino terminal group when using this supports at neutral pH values (MATEO et al., 2005).

In this study, three different immobilization conditions with CNBr support were evaluated: lipase immobilization under mild conditions, which was performed at 4 °C for 15 minutes (named mild CNBr); and lipase immobilization at 25 °C for 2 and 6 h (named CNBr 2 h and CNBr 6 h, respectively). The immobilization parameters observed for these conditions are shown in **Table 10**.

Table 10 - Immobilization parameters of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase on CNBr-activated agarose.

Derivative	Immobilization	Recovered	Specific activity (U/g)
	Yield (%)	Activity (%)	
Mild CNBr	21.02	100.00	1.43
CNBr 2 h	89.34	52.87	3.71
CNBr 6 h	89.09	51.01	2.76

In all cases was possible to immobilize *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase on CNBr support. Under mild conditions (mild CNBr) the immobilization yield was 21.01 % of the input activity. As expected, this immobilization yield was not very high, but the formation of any kind of multipoint covalent attachment was avoided due to low temperature and exposure time. On the other hand, all immobilized activity could be recovered and this derivative can be used as a model of lipase properties in absence of intermolecular phenomena. With the other two derivatives, CNBr 2 h and CNBr 6 h, higher

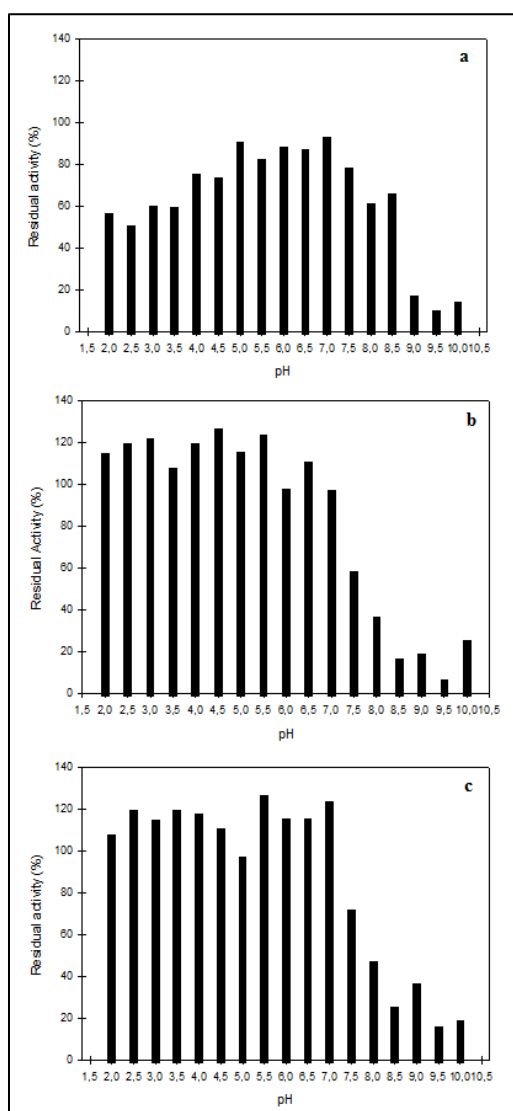
immobilization yields were obtained, but recovered activity was lower suggesting loss of activity during immobilization.

4.3.2 Characterization

4.3.2.1 Stability in different pH in aqueous media

The three derivatives obtained by covalent attachment to CNBr support were evaluated on their stability in different pH in aqueous media. Derivatives were incubated in different buffers (1:10, w/v), at 25 °C, for 24 h and the results are shown in **Figure 8**.

Figure 8 – CNBr derivatives stability in different pH in aqueous media.



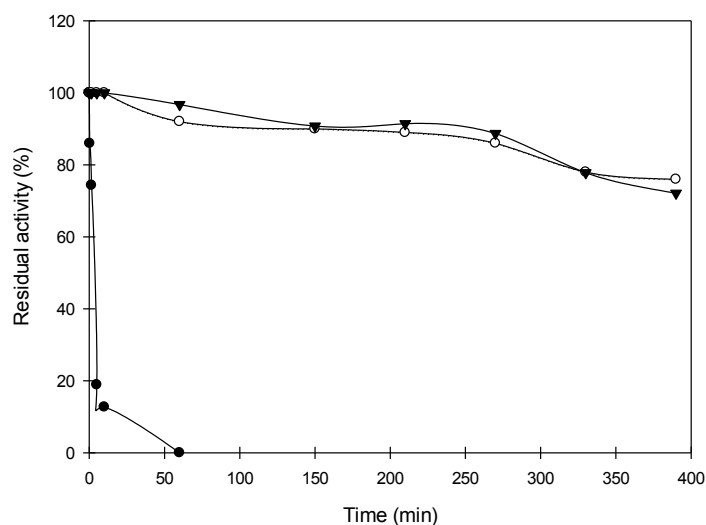
(a) Mild CNBr; (b) CNBr 2 h; (c) CNBr 6 h. Derivatives were incubated for 24 h, at 25 °C, under non-reactive conditions, in buffers: 0.5 M glycine-HCl for pH 2.0 and 2.5; McIlvaine buffer for pH 3.0 to 8.0; 0.5 M Tris-HCl buffer for pH 8.5 and 9.0; and 0.5 M glycine-NaOH buffer for pH 9.5 and 10.0.

In general, all derivatives were more stable in acidic-neutral pH, showing low residual activity on alkaline pH. However, CNBr 2 h and CNBr 6 h were much more stable than mild CNBr, with residual activities even higher than before incubation (activities over 100 %). This result suggests that higher temperature and longer immobilization time led to greater stabilization of lipase structure.

4.3.2.2 Thermal stability

In order to evaluate and compare thermal stability, CNBr derivatives were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer pH 7 (1:10, w/v) at 60 °C, with suspension samples being periodically withdrawn and analyzed by pNPP assay. Time-course of derivatives inactivation are show in **Figure 9** and kinetics parameters of thermal stability are presented in **Table 11**.

Figure 9 – Thermal stability of CNBr derivatives at 60 °C.



(●) Mild CNBr; (▼) CNBr 2 h; (○) CNBr 6 h. Derivatives were incubated in 5 mM sodium phosphate buffer pH 7 and activity was measured by the pNPP assay.

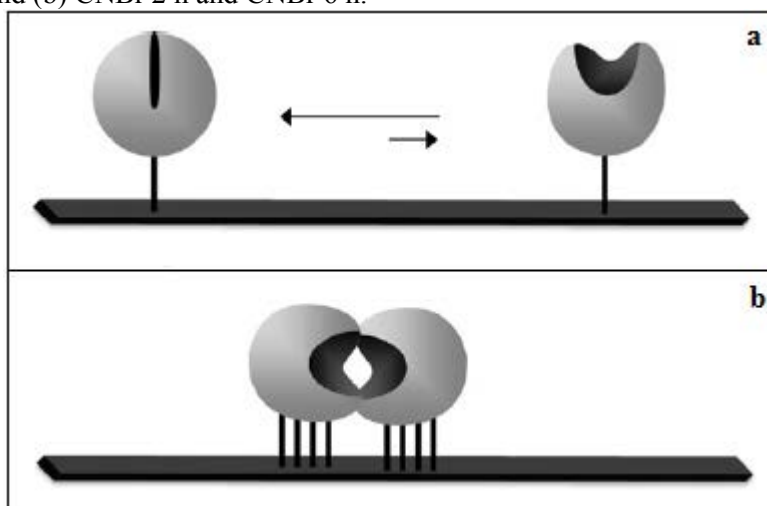
Table 11 – Kinetics parameters of CNBr derivatives thermal stability.

Derivative	K_d (min^{-1})	$T_{(1/2)}$ (min)	SF
Mild CNBr	0.2060	3.36	-
CNBr 2 h	0.0008	835.12	248.54
CNBr 6 h	0.0007	990.21	294.70

K_d – thermal deactivation constant; $T_{(1/2)}$ – derivative half-life; SF – stabilization factor.

The results show that mild CNBr was much less stable at 60 °C than CNBr 2 h and CNBr 6 h, with half-lives of 3.36, 835.12 and 990.21 min, respectively. Protocol used for CNBr 2 h and 6 h was able to achieve stabilization factors of almost 250 and 295, respectively, when compared to mild CNBr. Those significant differences in derivatives thermal stability may suggest that the protocol used for mild CNBr immobilized monomeric lipase by one covalent bond, while lipases in CNBr 2 h and CNBr 6 h are probably attached by multipoint bonds through possible lysine residues on the surface of the enzyme that may have altered p*K*. Such high stabilization factors also suggest that molecules may be immobilized as bi-aggregates in CNBr 2h and CNBr 6 h (**Figure 10**).

Figure 10 - Schematic representation of how the different CNBr derivatives may be immobilized: (a) mild CNBr and (b) CNBr 2 h and CNBr 6 h.



Source: adapted from Lima et al. (2013).

4.3.2.3 Hydrolysis of fish oil in aqueous media

Besides performing hydrolysis of fish oil with hydrophobic derivatives, this reaction was also carried out with CNBr derivatives and the soluble free enzyme (**table 12**). As catalytic properties of CNBr 2 h and CNBr 6 h were quite similar and they both must be immobilized as dimers, hydrolysis was performed only with CNBr 2 h. This derivative was compared to the soluble free enzyme because this is the condition in which bi-aggregates are also found.

Table 12 - Hydrolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases on CNBr derivatives.

Derivative	Initial Activity ^a	Selectivity ^b
CNBr 2h	0.070	6.63
Mild CNBr	0.055	11.60
Free enzyme	0.078	4.78

Reaction was carried out in an aqueous/organic biphasic system, with McIlvaine buffer pH 5,0/cyclohexane (1:1), at 45 °C and 150 rpm.

^aInitial activity is expressed as μmol of hydrolyzed PUFA (EPA + DHA) per minute and per gram of immobilized protein.

^bSelectivity is expressed as the ratio between % of hydrolyzed EPA and % of hydrolyzed DHA. All parameters were calculated after 24h of reaction.

The hydrolysis rates obtained when lipase was in dimeric forms (CNBr 2 h and soluble free lipase) are higher than the one observed for mild CNBr. In this kind of support, lipases cannot undergo interfacial activation by oil drops, being able to hydrolyze only oil molecules partitioned into the aqueous phase of the biphasic reaction system (FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2011a). This difference observed in hydrolysis rates may be related to the fixation of the open structure of the enzyme on the dimers, where both active centers are in close contact. On the other hand, lipases immobilized on mild CNBr behave as they do in monomers; that is, in equilibrium between a higher percentage of closed and inactive molecules and in a lower percentage of open and active molecules (**Figure 10**). However, much higher selectivity is observed with mild CNBr.

4.3.3 Glyoxyl agarose derivatives

The results observed with CNBr derivatives suggested that *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipase could have been immobilized in a dimeric way, as bimolecular aggregates, due to the elevated stability observed for CNBr 2 h and CNBr 6 h. To elucidate this pattern, a study with glyoxyl agarose support was developed.

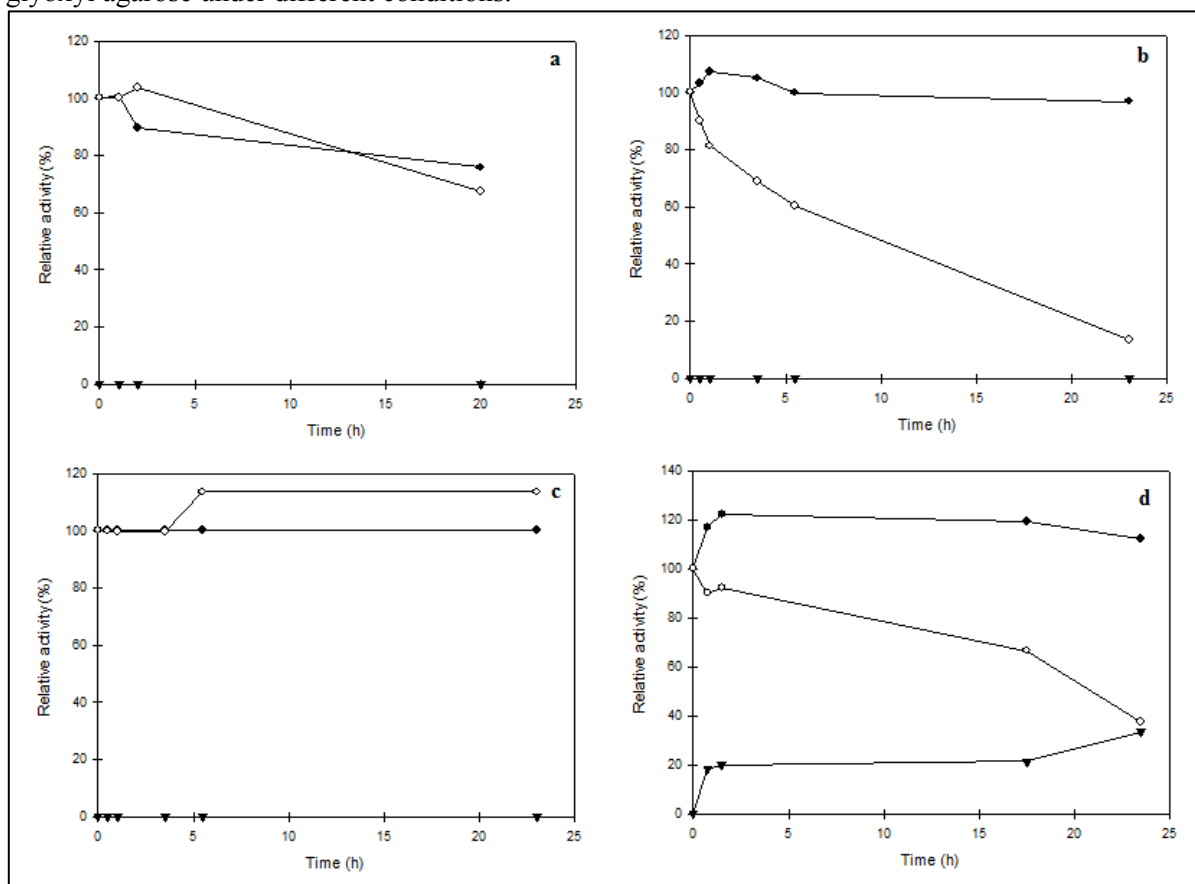
Glyoxyl agarose supports are obtained by activation and oxidation of agarose hydroxyl groups with glyceryl groups, resulting in activated short chain aldehydes (support-0-CH₂-CHO). Glyoxyl-activated supports are able to react with non-ionized amino

groups, forming very unstable Schiff's bases. In this way, they are not able to immobilize enzymes via a single enzyme-support attachment (LIMA et al., 2013). Therefore, immobilization on glyoxyl supports should be performed under alkaline conditions, where multipoint covalent attachments between two or more lysine residues could take place, since their pK are generally around 10.5-10.7 (MATEO et al., 2005). At pH lower than 10, glyoxyl supports are not able to immobilize monomeric enzymes that have only one reactive amino terminus (LIMA et al., 2013).

In the case of bimolecular lipase aggregates, the two open active centers of each molecule are in close contact one with the other, forming stable aggregates. In this situation, glyoxyl supports might be able to covalently immobilize those bimolecular aggregates when both amino terminals are on the same planar surface and the aggregates would be immobilized by simultaneous multipoint immobilization of both amino terminals (LIMA et al., 2013).

In the present study, four different conditions of immobilization on glyoxyl supports were evaluated, all in sodium bicarbonate buffer 0.1 M pH 8.5: (a) at 4 °C; (b) at 25 °C; (c) at 25 °C in presence of 1.5 % of TX-100; and (d) at 25 °C with a resin containing low concentration of glyoxyl groups. Time-courses of immobilizations of *Penicillium* sect Gracilentia CBMAI 1583 lipase on glyoxyl agarose under these conditions are shown in **figure 11**.

Figure 11 – Time-course of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase immobilization on glyoxyl agarose under different conditions.



(a) 4 °C; (b) 25 °C; (c) 25 °C in presence of 1.5 % of TX-100; (d) 25 °C with resin prepared with low concentration of glyoxyl groups. In all cases, immobilization was performed in sodium bicarbonate buffer 0.1 M pH 8.5. (●) Control; (○) Supernatant; (▼) Recovered activity.

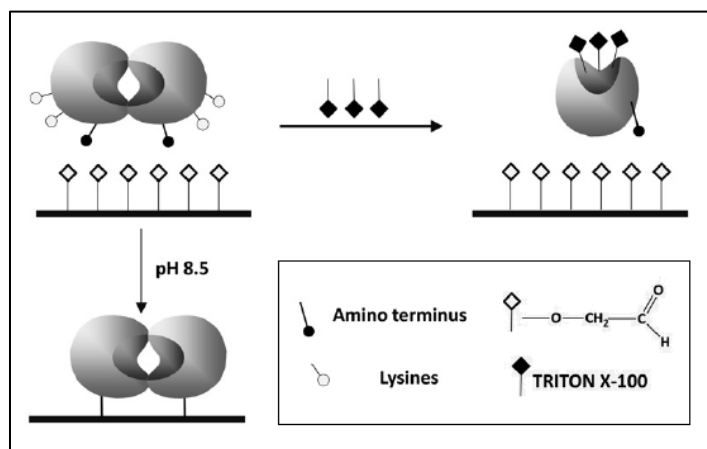
In condition (a) lipase could not be immobilized on glyoxyl agarose, since the decrease observed in the supernatant was also observed in the control, what shows enzyme inactivation, and in addition no activity could be detected in the suspension (no recovered activity). This might be related to the lack of energy available to form covalent bonds, since temperature is too low.

In condition (b), where lipase solution was offered for glyoxyl support in pH 8.5 at 25 °C, immobilization was achieved, since no decrease of activity was observed in the control and the activity in supernatant significantly decreased after 24 h. However, no recovered activity was detected. This might be related to the fact that covalent interactions are followed by the formation of Schiff's bases between aldehyde groups and amino groups. This kind of interaction is likely to result in strong rigidification with undesired mobility restriction of the enzyme or even displacement of the active site, what may

inactivate the lipase (CUNHA et al., 2008). Because lipase could be immobilized under these conditions, where only the amino terminal of molecules are reactive, they are probably forming bimolecular aggregates with both amino terminal on the same plane.

To confirm if *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 lipases are forming bi-aggregates, result obtained from condition (b), lipase in presence of 1.5 % TX-100 was offered for immobilization (condition c). In this case, immobilization was not achieved, since all activity remained in the supernatant, even after 24 h. The non-covalent bimolecular aggregates formed by some soluble lipases may be dissociated in the presence of detergents, by stabilization of the open form of these enzymes (LIMA et al., 2013). The monomeric lipases obtained in presence of TX-100 are not able to form multipoint covalent bonds with glyoxyl groups, since only one amino terminal is available to react at pH 8.5. In this way, it was possible to understand that soluble lipase from *Penicillium* sect Gracilenta CBMAI 1583 forms bimolecular aggregates. Cases (b) and (c) are illustrated on **figure 12**.

Figure 12 - Schematic representation of the immobilization of monomeric and dimeric lipases on glyoxyl supports.



Source: adapted from Lima et al. (2013).

Because no activity could be recovered from immobilization of bi-aggregates at 25 °C and no immobilization was achieved at 4 °C, lipase solution was offered to a less activated support, as an attempt of immobilization under milder conditions that might recover activity (condition d). Although immobilization was observed and some activity could be recovered, the variation in absorbance measured in the spectrophotometer was too low to work with. In this way, glyoxyl derivative obtained in condition (d) was not characterized or used in the hydrolysis of fish oil.

5 CONCLUSIONS

Penicillium sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase was immobilized via adsorption on hydrophobic and ionic supports and via covalent attachment to CNBr Sepharose and glyoxyl agarose. Stabilized derivatives were characterized and used for the production of omega-3 fatty acids and ethyl esters.

On hydrophobic supports, activation was observed only with octyl agarose (1.5-fold factor), but significant activities could be recovered with all six supports tested. The most selective support for lipase adsorption was phenyl agarose, constituting a great support for simultaneous immobilization and purification of *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase. It was possible to observe that immobilization parameters and derivatives characteristics depend not only on the enzyme used, but also on the internal morphology of the supports and on the groups coating them.

Hydrophobic derivatives were characterized on their ability to reuse towards pNPP hydrolysis, stability in different pH, temperatures and organic media, and on their adsorption strength. Immobilization was a successful strategy for stabilizing this lipase, since all hydrophobic derivatives may be considered more stable than mild CNBr derivative, taken as a model of enzyme behavior in absence of intermolecular phenomena. Oct could be efficiently reused for 4 cycles and phe for 7 cycles. Sepab was the most stable derivative in the wide range of pH tested. In the case of thermal stability, stabilization factors around 40 could be achieved with octyl and toyopearl butyl derivatives at 60 °C. In presence of organic solvents, the nature of solvent seemed to be more decisive in octyl derivative stability than their hydrophobicity or hydrophilicity. Lipase strongest adsorption was on Octadecyl Sepabeads[®], derivative in which 5 % of TX-100 was necessary to completely desorb the enzyme.

Hydrolysis of fish oil showed that these hydrophobic derivatives could be very useful in obtaining mixtures of EPA and DHA, while mild CNBr derivative could be used to enrich EPA contents in fish oils. Ethanolysis was performed in presence and absence of solvents. The most active condition was Lew in *tert*-amyl alcohol and could be useful for ethyl esters synthesis. The most selective condition was Toyo in *tert*-amyl alcohol, in which EE-EPA could be purely obtained with this reaction.

Among the hydrophobic supports evaluated, Phenyl Sepharose was found to be an interesting support for *Penicillium* sect *Gracilentia* CBMAI 1583 lipase adsorption, since it was the most selective support for protein adsorption, the better suited for derivative reuse, the most stable derivative at 70 °C and the most active and selective derivative for fish oil hydrolysis.

Immobilization on ionic supports could not recover any activity; however, it was possible to conclude that this lipase has a negative net electric charge at pH 7 since it was rapidly immobilized on anion exchangers and it was not immobilized on cation exchangers. In the case of immobilization on CNBr activated Sepharose, immobilization parameters and derivatives characterization brought up the possibility of multipoint covalent attachment of bi-aggregates. CNBr 2 h and CNBr 6 h were much more stable to pH and temperature than mild CNBr, reaching stabilization factors of 248.54 and 294.70 at 60 °C, respectively. CNBr derivatives were also evaluated for release of omega-3 fatty acids in the hydrolysis of fish oil. Dimeric derivatives were more active but less selective than monomeric derivative (mild CNBr).

The study of lipase immobilization by covalent attachment to glyoxyl agarose confirmed that it forms dimers, since it was immobilized in pH 8.5 in absence of TX-100 but not in presence of this detergent.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prospecção de novas fontes microbianas produtoras de enzimas é uma linha de pesquisa importante dentro dos contextos econômico, científico e tecnológico atual, especialmente em países como o Brasil, os quais importam a maior parte das enzimas utilizadas. No presente trabalho, a biodiversidade brasileira foi explorada através da investigação de uma enzima produzida por uma linhagem de um fungo filamentosos isolada de solo de Mata Atlântica.

Este trabalho consistiu no estudo de uma lipase extracelular do fungo filamentosos *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583, através da purificação, imobilização e caracterização, bem como de sua aplicação na obtenção de ácidos graxos ômega-3.

A caracterização da lipase presente no filtrado de cultura evidenciou características interessantes desta enzima, como pH ótimo ácido (pH 4,0), elevada temperatura ótima (70 °C), estabilidade em diversas condições de pH e temperaturas e ativação na presença de detergentes não iônicos. Esta lipase foi purificada em apenas uma etapa de cromatografia de interação hidrofóbica, com recuperação de mais de 80 % da atividade inicial e fator de purificação de mais de 500, podendo ser aplicada em escala industrial em preparações que requerem elevados graus de pureza, como na indústria farmacêutica. A enzima purificada apresentou o mesmo perfil de pH e temperatura ótimos que a enzima bruta, porém foi mais estável ao pH e menos termoestável que esta. A lipase purificada foi estável na presença de diferentes substâncias, íons e solventes orgânicos apolares; foi capaz de hidrolisar ésteres de p-nitrofenila com diferentes tamanhos de cadeia carbônica; propriedades estas favoráveis a futuras aplicações dessa lipase de *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 em tratamentos de efluentes industriais, formulação de sabões e detergentes, sínteses orgânicas e na indústria de alimentos.

A ampla gama de possíveis aplicações para a lipase em questão motivou estudos que permitissem seu uso em escala industrial, como a imobilização através de diferentes técnicas em diversos suportes. A imobilização foi eficiente na estabilização da lipase, sendo observados fatores de estabilização de até 294 em relação à estabilidade térmica. Um aspecto importante da imobilização de enzimas é o reuso dos derivados e, neste trabalho, foi possível utilizar o derivado fenil Sepharose por sete ciclos. Os derivados imobilizados

catalisaram seletivamente a hidrólise e a etanólise do óleo de sardinha, liberando preferencialmente o ácido graxo EPA e seu éster etílico, respectivamente.

A estimativa da massa molecular da lipase através de dois métodos distintos sugeriu a presença de agregados diméricos da enzima no seu estado nativo. A imobilização no suporte glioxil agarose confirmou esta hipótese, uma vez que foi possível imobilizá-la na ausência de detergente, mas não na presença desta substância.

Considerando que a lipase secretada por *Penicillium* sect. *Gracilentia* CBMAI 1583 se mostrou interessante para diversas aplicações industriais, seria interessante estudar outros aspectos como: o aumento de sua produção através de sequenciamento e identificação da proteína e sequenciamento, clonagem e super expressão do gene responsável por essa enzima; bem como a obtenção de derivados imobilizados mais carregados e otimização das condições de reação empregadas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAHA, Y. R.; GABALLAB, A. A. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* Toshki in *Escherichia coli*. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 13–20, 2008.
- ALHIR, S.; MARKAKIS, P.; CHANDAN, R.C. Lipase of *Penicillium caseicolum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 38, p. 598–601. 1990.
- ALMEIDA, A. F. **Produção, purificação e propriedades bioquímicas de lipase ácida de *Candida viswanathii***. 2012. 211f. Tese (doutorado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2012.
- ALMEIDA, A. F.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; CARMONA, E. C. Influence of carbon and nitrogen sources on lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. **Annals of Microbiology**. V. 63, p. 1225-1234. 2013.
- ANDREWS, P. Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. **Journal of Biochemistry**. V. 91, p.222-233, 1964.
- ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A.S.; DE-ANDRADE, R.A.; AGUIEIRAS, E.C.G.; ANDRADE, G.C.; MOURA, M.V.; ALMEIDA, R.V.; FREIRE, D.M. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2014, 2014.
- ARAVINDAM, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**. V. 6, p. 151-158, abr. 2007.
- ARROYO, M. Inmovilización de enzimas: fundamentos, métodos y aplicaciones. **Archives Pharmaceutica**, v. 39, n. 2, p. 23-39, 1998.
- ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H.M.N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56-66, 2014.
- BAE, J.; KWON, M.; KIM, I.; HOU, C.T.; KIM, H. Purification and characterization of a cold-active lipase from *Pichia lynferdii* Y-7723: pH-dependant activity deviation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 5, p. 851–857, 2014.
- BANCERZ, R.; GINALSKA, G.; FIEDUREK, J.; GROMADA, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. V. 32, n. 6, p. 253-260. 2005.
- BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. A single step purification, immobilization and

hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p.486-493, 1998.

BCC RESEARCH. **Global markets for enzymes in industrial applications**. 2014. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-bio030h.html>. Acesso em 02 de junho de 2015.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in Polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**. V. 31, p. 1639–1650, 2009.

BRASIL. **Constituição federal**. DECRETO N° 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6041.htm. Acesso em 03 de junho de 2015.

BRANCO, R. V.; GUTARRA, M. L. E.; FREIRE, D. M. G.; ALMEIDA, R. V. Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

BROCCA, S.; SECUNDO, F.; OSSOLA, M.; ALBERGHINA, L.; CARREA, G.; LOTTI, M. Sequence of the lid affects activity and specificity of *Candida rugosa* lipase isoenzymes. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 12, p. 2312–2319, 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 Technology**, v. 97, p. 2195-2210, 2006.

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

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

CHAHINIAN, H.; VANOUT, G.; IBRIK, A.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a parcial acylglycerol lipase. **Biosciences Biothechnology and Biochemistry**. V. 64, n. 2, p. 215-222. 2000.

COSTA, M. A.; PERALTA, R. M. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). **Journal of Basic Microbiology**. V. 39, n. 1, p. 11-15, mar. 1999.

CUNHA, A. G.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; BEVILAQUA, J. V.; DESTAIN, J.; PAIVA, L. M. C.; FREIRE, D. M. G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase—a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 49-56, 2008.

CUNHA, A. G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUTARRA, M. L. E.; BEVILAQUA, J. V.; ALMEIDA, R. V.; PAIVA, M. L. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; CYGLER, M.; SCHRAG, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in enzymology**, v. 284, p. 3-27, 1997.

FREIRE, D. M. G. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 156, p. 563-575, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO M.G.; SOLDI. V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DANIEL, R. M. The upper limits of enzyme thermal stability. **Enzyme and Microbial Biotechnology**. V. 19, p. 74-79. 1996.

DARVISHI, F. Expression of native and mutant extracellular lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 634–641, 2012.

DEETH, H. C. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 6, p. 555–562, 2006.

DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABUB, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain of *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 72, p. 256– 262, 2011.

DOSANJH, N. S.; KAUR, J. Biochemical Analysis of a Native and Proteolytic Fragment of a High-Molecular-Weight Thermostable Lipase from a Mesophilic *Bacillus* sp. **Protein Expression and Purification**. V. 24, p. 71-75. 2002.

DRUET, D.; EL ABBADI, N.; COMEAU, L. C. Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 42, n. 6, p. 923-930. 1992.

FADILOGLU, S.; SOYLEMEZ, Z. Olive oil hydrolysis by celite-immobilized *Candida rugosa* lipase. **Journal Agriculture Food Chemistry**, vol. 46, p. 3411-3414, 1998.

FARNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl fluorides as inhibitors of esterases. I. Rates of reactions with acetylcholinesterase, alpha-chymotrypsin and trypsin. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 85, p. 997-1000, 1963.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BATISDA, A.; GUISAN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; GUISÁN, J. M. Release of Omega-3 Fatty Acids by the Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 88, p. 1173-1178, 2011a.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A. V.; PALOMO, J. M.; GUISÁN, J. M. Modulation of the selectivity of immobilized lipases by chemical and physical modifications: release of omega-3 fatty acids from fish oil. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 89, n. 1, p. 97-102, 2012.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1061-1067, 2008.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; CABRERA, Z.; GUISAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 565-569, 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; ORTIZ, C.; CABRERA, Z.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**. V. 7, p. 2610-2615. 2006.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PIZARRO, C.; LÓPEZ-VELA, D.; BETANCOR, L.; CARRASCOSA, A.V.; PESSELA, B.; GUISAN, J. M. Hydrolysis of fish oil by lipases immobilized inside porous supports. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 88, p. 819-826, 2011b.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods in Enzymology**, v. 286, p. 327-346, 1997.

FOJAN, P.; JONSON, P. H.; PETERSEN, M. T. N.; PETERSEN, S. B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. **Bioquímie**. V. 82, p. 1033-1041, 2000.

FONSECA, T. S.; SILVA, M.R.; OLIVEIRA, M.C.F.; LEMOS, T.L.G.; MARQUES, R.A.; MATTOS, M.C. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 492, p. 76–82, 2015.

GANDHI, N. N. Applications of lipases. **Journal of the American Oil Chemistry Society**. v. 74, n. 6, p. 621-634, 1997.

GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification. **Enzyme Research**, v. 2013, p. 367-410, 2013.

GARLIPP, A. B. **Isolamento e identificação de fungos filamentosos do solo do Banhado Grande, na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, SP**. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP. 66 f. 1995.

GIROD, A.; WOBUS, C. E.; ZADORI, Z.; RIED, M.; LEIKE, K.; TIJSSEN, P.; KLEINSCHMIDT, J. A.; HALLEK, M. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 5, p. 973-978, 2002.

GOLDBECK, R.; FILHO, F. M. Screening, characterization, and biocatalytic capacity of lipases producing wild yeasts from Brazil biomes. **Food Science and Biotechnology**, v. 22, n. S1, p. 79–87, 2013.

GOPINATH, S. C. B.; HILDA, A.; PRIYA, T.L.; ANNADURAI, G.; ANBU, P. Purification of lipase from *Geotrichum candidum*: conditions optimized for enzyme production using Box-Behnken design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 681–689, 2003.

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

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 475–480, 2013.

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization stabilization of enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 375-382, 1988.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Methods in biotechnology. 2. ed. Totowa, Nova Jérsei: Humana Press. 449 p. 2006.

GUNCHEVA, M.; ZHIRYAKOVA, D. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 1-21, 2011.

GUPTA, R.; KUMARI, A.; SYAL, P.; SINGH, Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GUPTA, R.; RATHI, P.; BRADDOO, S. Lipase Mediated Upgradation of Dietary Fats and Oils. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, n. 6, p. 635-644, 2003a.

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

GUTARRA, M. L. E.; GODOY, M. G.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L.R. **Bioresource Technology**. V. 100, p. 5249–5254. 2009.

HAMES B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990, 383 f., 2 ed.

HAMES B. D. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In: HAMES B. D.; HAMES B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990, 383 f., 2 ed.

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

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HAWKSWORTH, D. L. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? **Biodiversity Conservation**, v. 21, p. 2425-2433, 2012.

HIOL, A.; JONZO, M.D.; RUGANI, N.; DRUET, D.; SARDA, L.; COMEAU, L.C. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 421–430, 2000.

HOLMQUIST, M. Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: structures, functions and mechanisms. **Current Protein and Peptide Science**, vol. 1, n. 2, p. 209-235, 2000.

HORIKAWA, S; OGAWARA, H. A simple and rapid procedure for removal of TX-100 from protein solution. **Analytical Biochemistry**. V. 97, p. 116-119. 1979.

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

- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 118, p. 155-170, 2004.
- HUBE, B.; STEHR, F.; BOSSENZ, M. MAZUR, A.; KRETSCHMAR, M.; SCHAFER, W. Secreted lipases of *Candida albicans* : cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 5, p. 362-374, 2000.
- IBRAHIM, C.O. Development of applications of industrial enzymes from Malaysian indigenous microbial sources. **Bioresource Techonology**. V. 99, p. 4572-4582, 2008.
- IBRIK, A.; CHAHINIAN, H.; RUGANI, N.; SARDA, L.; COMEAU, L. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. **Lipids**. V. 33, n. 4, p. 377-383. 1998.
- JAEGER, K. E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL. M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- JANSON, J. C.; RYDEN, L. **Protein purification**. 2. ed. Wiley-VCH. 1998.
- JERMSUNTIEA, W.; AKI, T.; TOYOURA, R.; IWASHITA, K.; KAWAMOTO, S.; ONO, K. Purification and characterization of intracellular lipase from the polyunsaturated fatty acid-producing fungus *Mortierella alliacea*. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 158–164, 2011.
- JOERGER, R. D.; HAAS, M.J.. Overexpression of a *Rhizopus delemar* lipase gene in *Escherichia coli*. **Lipids**, v. 28, n. 2, p.; 81-88, 1993.
- KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA. R.; DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5-6, p. 307–313, 2003.
- KAMINI, N. R.; FUJII, T.; KUROSU, T.; IEFUJI, H. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 317–324, 2000.

- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.
- KEMPKA, A. P.; LIPKE, N. L.; PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; TREICHEL, H.; FREIRE, D. M. G.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosyst Engineering**. V. 31, p. 119-125. 2008.
- KIM, I.; LEE, S.; LEE, B.; PARK, H.; KIM, J.; KWON, K.; KIM, J.; LEE, J.; KIM, Y. Interesterification of olive oil with a fully hydrogenated fat in a batch reactor using step changes in temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5942–5946, 2008.
- KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi**. 10. ed. CAB International, Wallingford. 2008.
- KOWN, M.; KIM, H. S.; HAHM, D.; SONG, J. K. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. **Biotechnology Letters**. V. 33, p. 741-746. 2011.
- 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 Expression and Purification**. V. 41, p. 38-44. 2005.
- LI, S.; YANG, X.; YANG, S. ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.
- LI, N.; ZONG, M. Lipases from the genus *Penicillium*: production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 66, p. 43-54, 2010.
- LIMA, L. N.; ARAGON, C. C.; MATEO, C.; PALOMO, J. M.; GIORDANO, R. L. C.; TARDIOLOI, P. W.; GUI SAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 118-123, 2013.
- 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. **Biochemical Engineering Journal**. V. 18, n. 1, p. 65-71. 2004.
- LIU, Y-C.; MARANGONI, A. G.; YADA, R. Y. Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. **Food Research International**, vol. 31, no. 3, p. 243-248, 1998.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 3, p. 445–451, 2008.

LU, Z.; OH, S. H.; ZHOU, S.; ZOU, H.; PARK, D.; PARK, S. J.; ZHOU, H.; BHAK, J.; PARK, Y.; ZOU, F. Structural analysis and inhibitory kinetics of brain type creatine kinase by sodium dodecyl sulfate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 160, p. 831-842. 2010.

MA, J.; ZHANG, Z.; WANG, B.; KONG, X.; WANG, Y.; CAO, S.; FENG, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, v. 45, p. 22–29, 2006.

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

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N.G.; LORENZONI, A.S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M.A.Z.; RODRIGUES, R.C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311–2316, 2011.

MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Biosciences Biothecnology and Biochemistry**. V. 59, n. 2, p. 329-330. 1995.

MATEO, C.; ABIAN, O.; BERNEDO, M.; CUENCA, E.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; GRAZU, V.; PESSELA, B. C. C.; GIACOMINI, C.; IRAZOQUI, G.; VILLARINO, A.; OVSEJEVI, K.; BATISTA-VIERA, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technonology**, v. 37, p. 456-462, 2005.

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

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 93–98, 1993.

MENDES, A. A.; FREITAS, L.; CARVALHO, A. K. F.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Immobilization of a Commercial Lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by Different Strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-8, 2011a.

MENDES, A. A.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. V. 68, p. 109-115, 2011a.

- MENONCIN, S.; DOMINGUES, N.; FREIRE, D.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, J.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Study of the extraction, concentration, and partial characterization of lipases obtained from *Penicillium verrucosum* using solid-state fermentation of soybean bran. **Food and Bioprocess Technology**. V. 3, n. 4, p. 537-544. 2010.
- MHETRAS, N. C.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. **Bioresource Technology**. V. 100, p. 1486-1490, 2009.
- MIRANDA, J. S.; SILVA, N. C. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; LAGE, F. A. P.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 251, p. 392-403, 2014.
- MOGENSEN, J. E.; SEHGAL, P.; OTZEN, D. E. Activation, inhibition, and destabilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase by detergents. **Biochemistry**. V. 44, p. 1719-1730. 2005.
- MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. Revista processos químicos. p. 9-23, jan-jun. 2009.
- 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 and Fuels**, v. 21, n. 6, p. 3689-3694, 2007.
- MORENO-PÉREZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. Selective ethanolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 91, p. 63-69, 2014.
- MOUNGUENGUI, R.W.M.; BRUNSCHWIG, C.; BARÉA, B.; VILLENEUVE, P.; BLIN, J. Are plant lipases a promising alternative to catalyze transesterification for biodiesel production? **Progress in Energy and Combustion Science**, V. 39, P. 441-456, 2013.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.
- NO, D. S.; ZHAO, T.; LEE, J.; LEE, J.; KIM, I. Synthesis of Phytosteryl Ester Containing Pinolenic Acid in a Solvent-Free System Using Immobilized *Candida rugosa* Lipase. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 61, p. 8934-8940, 2013.
- NOINVILLE, S.; REVAULT, M.; BARON, M.; TISS, A.; YAPOUDJIAN, S.; IBANOVA, M.; VERGER, R. Conformational changes and orientation of *Humicola lanuginosa* lipase

on a solid hydrophobic surface: an in situ interface fourier transform infrared-attenuated total reflection study. **Biophysical Journal**, v. 82, p. 2709-2719, mai. 2002.

OLLIS, D. L.; CHEAH, E.; CYGLER, M.; DIJKSTRA, B.; FROLOW, F.; FRANKEN, S.; HAREL, M.; REMINGTON, S. J.; SILMAN, I.; SCHRAG, J.; SUSSMAN, J. L.; VERSCHUEREN, K. H.G.; GOLDMAN, A. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, vol. 5, n. 3, p. 197-211, 1992.

OSBORN, H. T.; AKOH, C. C. Structured Lipids—Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p. 110-120, 2002.

OZTURK, B. DISSERTAÇÃO. **Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports**. Disponível em: <http://library.iyte.edu.tr/tezler/master/biyoteknoloji/T000031.pdf>. Acesso em 11 de junho de 2015.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 456–462, 2005.

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

PEREIRA, M. G.; FACCHINI, F. D.A; FILÓ, L.E.C.; POLIZELI, A.M.; VICI, A.C.; JORGE, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; PESSELA, B.C.; GUIBAN, J.M.; POLIZELI, M.L.T.M. Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 561-570, 2015.

PIMENTEL, M. C. B.; KRIEGER, N.; COELHO, L. C. C. B.; FONTANA, J. O.; MELO, E. H. M.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA, J. L. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 49, n. 1, p. 59-74. 1994.

PIZARRO, C.; BRAÑES, M .C.; MARKOVITS, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUIBÁN, J. M.; CHAMY, R.; WILSON, L. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 111-118, 2012.

POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4639-4750, 2002.

PRLAINOVIC, N.Z.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z.D.; MIJIN, D.Z.; BEZBRADICA, D.I. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads[®]: the effect of lipase oxidation by periodates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 803–810, 2011.

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

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A.M.; COELHO, M.A.Z.; FREIRE, D.M.G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990, 383 f., 2 ed.

ROYON, D.; DAZ, M.; ELLENRIEDER, G.; LOCATELLI, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 648–653, 2007.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. **Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins**, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. V. 27, n. 2, p. 205-211, abr.-jun. 2004.

RUIZ, B.; FARRÉS, A.; LANGLEY, E.; MASSO, F.; SÁNCHEZ, S. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Penicillium candidum*. **Lipids**. V. 36, n. 3, p. 283-288. 2001.

SANDOVAL, G. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 161-178, 2012.

SANGSTER, J. Octanol-water partition coefficients of simple organic compounds. **Journal of Physical Chemical Ref. Data**, vol. 18, no. 3, p. 1111, 1227, 1989.

SARDA, L.; DESNUELLE, P. Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 30, p. 513-521, 1958.

SARKAR, P.; YAMASAKI, S.; BASAK, S.; BERA, A.; BAG, P.K. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 858–866, 2012.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 1, p. 1–18, 2003.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**. V. 52, p. 1-18, 2003.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. Nova Iorque: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional

- determinant of lipase activity and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 166–170, 2006.
- SETH, S.; CHAKRAVORTY, D.; DUBEY, V. K.; PATRA, S. An insight into plant lipase research - challenges encountered. **Protein Expression and Purification**, v. 95, p. 13–21, 2014.
- SCHRAG, J.D.; CYGLER, M. Lipases and α/β hydrolase fold. **Methods in enzymology**, v. 284, p. 85-107, 1997.
- SCHRAG, J.D.; LI, Y.; WU, S.; CYGLER, M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, v. 351, p. 761-765, 1991.
- SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J.S.; BOLINA, I.C.A.; SILVA, W.C.; HIRATA, D.B.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139–149, 2014.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology advances**. V. 19, p. 627-662. 2001.
- SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 166, p. 486-520, 2012.
- SINGH, M. K. et al. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 92–99, 2014.
- SMITH, P.K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, vol. 150, p. 76-85, 1985.
- SNELLMAN, E. A.; COLWELL, R. R. Acinetobacter lipases: molecular biology, biochemical properties and biotechnological potential. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 391-400, 2004.
- SOUZA, L.T.A. TESE. **Avaliação do potencial lipolítico das cepas *Aspergillus japonicus* LAB01 e *Moniliella spathulata* R25L270: características bioquímicas e aplicação biotecnológica das novas lipases fúngicas**. Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. 146 p. 2015.
- SPIEGEL, S.; FOSTER, D.; KOLESNICK, R. Signal transduction through lipid second messengers. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 159-167, 1996.

STOCKLEIN, W.; SZTAJER, H.; MENGE, U.; SCHMID., R. D. Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**. V. 1168, n. 2, p. 181-189, 1993.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: purification, characterization and its use for docohexaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 82, n. 5, p. 498-501. 1996.

SVENDSEN, A. Lipase protein engineering. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 2, p. 223-238, 2000.

TAN, T.W.; ZHAND, M.; XU, J.L.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**. V. 39, p. 1495–1502. 2004.

TANG, L. H.; XIA, L. M.; MIN, S.; GUO, H. Y. Purification and application of a lipase from *Penicillium expansum* PED-03. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 142, n. 2, p. 194-199. 2007.

TJOELKER, L. W.; EBERHARDT, C.; UNGER, J.; TRONG, H. L.; ZIMMERMAN, G. A.; McINTYRE, T. M.; STAFFORINI, D. M.; PRESCOTT, S. M.; GRAY, P. W. Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 43, p. 25481–25487, 1995.

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

TURATI, D. F. M. **Influência de parâmetros nutricionais e físicos sobre a produção de lipase por *Penicillium janthinellum***. 2012. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2012.

VAKHLU, J.; KOUR, A. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 69–85, 2006.

VALLADÃO, A.B.G.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Enzymatic pre-hydrolysis applied to the anaerobic treatment of effluents from poultry slaughterhouses. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 60, p. 219–225, 2007.

VALLADÃO, A.B.G.; SARTORE, P.E.; FREIRE, D.M.G.; CAMMAROTA, M.C. Evaluation of different pre-hydrolysis times and enzyme pool concentrations on the biodegradability of poultry slaughterhouse wastewater with a high fat content. **Water Science and Technology**, v. 60, p. 243–249, 2009.

VAQUERO, M.E.; BARRIUSO, J.; MEDRANO, F. J.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Heterologous expression of a fungal sterol esterase/lipase in different hosts: Effect on

solubility, glycosylation and production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p. 1-7, 2015.

VERGER, R. Enzyme kinetics of lipolysis. **Methods in Enzymology**, v. 64, p. 340-392, 1980.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis: B Enzymatic**, v.9, n.4-6, p. 113-148, 2000.

VOCUS; PRWEB. **Global Industrial Enzymes Market to reach US\$3.74 billion by 2015**, according to a new report by Global Industry Analysts, Inc. 2011. Disponível em: <http://www.prweb.com/releases/industrial_enzymes/proteases_carbohydrases/prweb8121185.htm>. Acesso em: 14 set. 2012.

WHITAKER, J. R.; PEREZ-VILLASEÑOR, J. Chemical modification of papain. I. Reaction with the chloromethyl ketones of phenylalanine and lysine with phenylmethylsulfonyl fluoride. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 124, p. 70-78, 1968.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

WILSON, L.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.. Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 259-264, 2006.

WOLSKI, E.; RIGO, E.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp using experimental design. **Letters in Applied Microbiology**. V. 49, n. 1, p. 60-66, 2009.

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

XIA, J.; HUANG, B.; NIE, Z.; WANG, W. Production and characterization of alkaline extracellular lipase from newly isolated strain *Aspergillus awamori* HB-03. **Journal of Central South University of Technology**, v. 18, n. 5, p. 1425-1433, 2011.

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

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384–391, 2007.

ZOUARI, N. et al. Purification and characterization of a novel lipase from the digestive glands of a primitive animal: The scorpion. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1726, p. 67–74, 2005.