



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

RAFAELA RODRIGUES DE BRITO

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COM ATIVIDADE DE
TRANSESTERIFICAÇÃO PRODUZIDA PELO NOVO ISOLADO
ACREMONIUM-LIKE ROG 2.1.9 EM MATRIZES A BASE DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.**

São José do Rio Preto/SP

Outubro, 2016

RAFAELA RODRIGUES DE BRITO

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE COM ATIVIDADE DE TRANSESTERIFICAÇÃO
PRODUZIDA PELO NOVO ISOLADO *ACREMONIUM*-LIKE ROG 2.1.9 EM
MATRIZES A BASE DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS E APLICAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE BIODIESEL.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes

**Tese apresentada ao programa de Pós Graduação
em Microbiologia do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas-Ibilce, da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
Unesp, Campus de São José do Rio Preto, para
obtenção do título de Doutor em Microbiologia**

Banca Examinadora

Prof^a. Dra Eleni Gomes

Professor Assistente Doutor

Unesp São José do Rio Preto

Prof^a. Dra _____

Professor _____

Prof^a. Dra _____

Professor _____

Sumário

Resumo	7
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	10
Lipases	10
Imobilização de lipases	12
Imobilização por adsorção.....	13
Imobilização Covalente	15
Suportes alternativos e de baixo custo	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Gerais	20
2.2. Específicos	20
3.1. Microrganismos.....	21
3.2. Obtenção das enzimas por FES	21
3.3. Dosagem das atividades enzimáticas.....	21
3.3.1. Atividade hidrolítica usando <i>p</i> -nitrofenol palmitato (<i>p</i> -NPP) como substrato.	21
3.3.2. Atividade hidrolítica usando <i>p</i> -nitrofenol butirato (<i>p</i> -NPB) como substrato	22
3.3. Determinação dos teores de proteínas totais	22
3.4. Concentração da solução de enzima.	22
3.5. Precipitação da enzima com Sulfato de amônio.	22
3.6. Caracterização parcial da lipase bruta	23
3.6.1. Efeitos da temperatura e pH sobre a atividade e estabilidade da enzima bruta	24
3.6.2. Estabilidade da enzima durante estocagem sob diferentes temperaturas.....	24
3.6.3. Estabilidade da enzima em presença de diferentes solventes orgânicos.....	24
3.6.4. Especificidade da enzima por diferentes substratos.	24
3.7. Imobilização da lipase em diferentes suportes.	25
3.7.1. Suportes utilizados	25
3.7.1.1. Preparo dos materiais lignocelulósicos como suportes para imobilização da enzima.	25
3.7.1.2. Preparação de MANAE (monoaminoetil- N – aminoetil) suportes a partir de materiais lignocelulósicos ligados ao grupo Glioxil	26
3.8. Preparo dos derivados (enzima imobilizada).	27
3.8.1. Imobilização reversível.....	27
3.8.2. Imobilização irreversível.	27
3.8.3. Avaliação da eficiência da imobilização da enzima.....	27
3.8.4. Dessorsão da lipase de suportes hidrofóbicos.	28
3.8.5. Dessorsão da lipase de suportes iônicos.	28

3.8.6. Estabilidade térmica dos derivados.....	28
3.8.7. Estabilidade dos derivados em etanol.	28
3.8.8. Efeito de solventes orgânicos e surfactantes na atividade enzimática dos derivados.	29
4.1. Caracterização parcial da lipase bruta.....	30
4.1.1. Efeito da temperatura e pH.	30
4.1.2. Estabilidade da enzima frente a variações do pH do meio quando em ausência de substrato	31
4.1.3. Estabilidade da enzima em diferentes temperaturas de incubação, quando em ausência de substrato	32
4.1.5. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade da lipase.	33
4.1.6. Especificidade por substratos ésteres de <i>p</i> -Nitrofenol.....	34
4.2. Imobilização da lipase de <i>Acremonium</i> -like ROG 2.1.9	35
4.2.1-Purificação parcial da lipase para imobilização.....	35
4.5. Avaliação da estabilidade dos derivados (enzimas imobilizadas) selecionados a 45°C e em etanol.	42
4.6. Efeito de solventes na atividade da lipase livre e imobilizada.	44
4.7. Efeito de surfactantes na atividade da lipase livre e imobilizada.	45
5-CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUTURA DA LIPASE DE <i>PSEUDOMONAS GLUMAE</i> NA CONFORMAÇÃO ABERTA COM UM SUBSTRATO LIGADO. O SÍTIO ATIVO CONSISTE DE SER87, ASP264 E HIS286. A ESTRUTURA ESTÁ ESTABILIZADA PELA LIGAÇÃO DE UM ÍON CÁLCIO. (BORNSCHEUER ET AL., 2002)	11
FIGURA 2. ESTRUTURA EM CRISTAL DA LIPASE DE <i>PSEUDOMONAS SP.</i> MIS38 INDICANDO OS DOIS LIDS (LID 1 E LID 2) NA CONFORMAÇÃO FICHADA (A) E NA CONFORMAÇÃO ABERTA (B). O LID 1 ESTÁ INDICADO NA COR ALARANJADA, O LID 2 NA COR VERDE. OS ÍONS CÁLCIO ESTÃO INDICADOS COMO ESFERAS AMARELA. (CHENG ET AL., 2012)	11
FIGURA 3. FORMAS DE IMOBILIZAÇÃO POR ADSORÇÃO SIMPLES. (A) IMOBILIZAÇÕES HIDROFÓBICAS A. BUTIL-SEPHAROSE, B. PHENIL-SEPHAROSE, C. HEXYL-TOYOPEARL, D. OCTIL-SEPHAROSE, E. DECAOCTIL SEPABEADS. (B) IMOBILIZAÇÃO IÔNICA. (PEREIRA ET AL., 2015)	14
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES GLIOXIL (MENDES, 2009).....	16
FIGURA 5 MECANISMO DE LIGAÇÃO COVALENTE MULTIPONTUAL DE ENZIMAS EM SUPORTE GLIOXIL-AMINO-GLUTARALDEÍDO. ADAPTADO DE MENDES ET AL. (2011).	17
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PREPARAÇÃO DE UM SUPORTE-GLIOXIL.....	26
FIGURA 7. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PREPARAÇÃO DO SUPORTE-GLIOXIL-MANAE	26
FIGURA 8. EFEITO DO PH NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE BRUTA	30
FIGURA 9. EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE BRUTA.	31
FIGURA 10. ESPECIFICIDADE DA LIPASE POR DIFERENTES SUBSTRATOS ÉSTERES DE P-NITROFENOL: P-NITROFENIL BUTIRATO (C4:0), P-NITROFENIL PALMITATO (C16:0), P-NITROFENIL DECANOATO (C10:0) E P-NITROFENIL LAURATO (C12:0).	35
FIGURA 11. GEL SDS-PAGE CORADO COM NITRATO DE PRATA. EB-EXTRATO BRUTO, MM-MARCADOR MOLECULAR.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 12. TEMPO CURSO DE IMOBILIZAÇÃO NOS DIFERENTES SUPORTES. (A) SUPORTES HIDROFÓBICOS SEM TRITON X-100 (B) SUPORTES HIDROFÓBICOS COM TRITON X-100 0,15% (V/V) (C) SUPORTES IÔNICOS.....	41
FIGURA 13. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA A 45°C (A) E ESTABILIDADE EM ETANOL (30% V/V) (B).....	44
FIGURA 14. EFEITO DE SOLVENTES NA ATIVIDADE DA LIPASE LIVRE E IMOBILIZADAS EM PEI-AGAROSE, MANAE-BAGAÇO E MANAE-SABUGO (A) ETANOL (B) N-HEXANO (C) DMSO (DIMETIL SULFÓXIDO).	45
FIGURA 15. EFEITOS DE SURFACTANTES NA ATIVIDADE DA LIPASE (A) TRITON X-100 (B) CTAB (C) SDS.	47

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. CONCENTRAÇÕES INICIAIS E FINAIS DE SULFATO DE AMÔNIO PARA PRECIPITAÇÃO DE ENZIMAS.....	23
TABELA 2. INFLUÊNCIA DO PH NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO CONCENTRADO.	32
TABELA 3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA CONCENTRADA.	32
TABELA 4. ESTABILIDADE DA LIPASE EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO.	33
TABELA 5. EFEITO DE DIFERENTES SOLVENTES ORGÂNICOS NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DO EXTRATO ENZIMÁTICO CONCENTRADO.	34
TABELA 6. TABELA DE PURIFICAÇÃO DA LIPASE DE ACREMONIUM-LIKE ROG 2.1.9 POR PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM SULFATO DE AMÔNIO.	36
TABELA 7. PROPRIEDADES DA LIPASE DE ACREMONIUM-LIKE ROG 2.1.9 IMOBILIZADA POR DIFERENTES PROTOCOLOS.....	39
TABELA 8. DESSORÇÃO DA LIPASE DOS DIFERENTES SUPORTES AVALIADOS USANDO NA CL E TRITON.....	42

Resumo

As lipases apresentam atividades catalíticas específicas as quais permitem seu uso em diferentes setores da indústria, como de alimentos, tratamento de águas residuais, cosméticos, farmacêuticos e biocombustíveis. A imobilização dessas enzimas torna mais eficiente sua aplicação uma vez que preserva suas propriedades bioquímicas nas condições reacionais e facilita recuperação e reutilização. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a lipase bruta produzida pelo fungo *Acremonium-like* ROG 2.1.9, purificá-la parcialmente e imobilizá-la em diferentes matrizes, incluindo resíduos agro-industriais, e sua utilização na produção de biodiesel por transesterificação enzimática. A enzima apresentou maior atividade a pH 7,0 e a 45°C e estabilidade na presença de n-hexano e metanol, com 92% e 40% de atividade residual, respectivamente, após 24 horas em presença daqueles compostos. A lipase mostrou ainda, especificidade por ácidos graxos de cadeia média como *p*-nitrofenil decanoato (C10:0), seguido de *p*-nitrofenil palmitato (C16:0). A enzima foi purificada parcialmente por precipitação fracionada com sulfato de amônio, com maior rendimento obtido na faixa entre 30-50% de saturação do sal. Após ser parcialmente purificada, a lipase foi imobilizada por adsorção em bagaço de cana e sabugo de milho não ativados, por meio de interação hidrofóbica em Sepabeads C18, Lewatit 105 e Lewatit 1600, por interação iônica em PEI-agarose, MANAE-sabugo de milho e MANAE-bagaço de cana e por ligação covalente multipontual em Glioxil-sabugo de milho e Glioxil-bagaço de cana. As imobilizações por interação iônica apresentaram os maiores rendimentos, com aumento de 100% na atividade da enzima imobilizada em MANAE-sabugo e os derivados gerados a partir destes suportes foram selecionados para os trabalhos seguintes. O derivado Lip-MANAE-sabugo apresentou maior força de interação iônica (a enzima não se dissociou da matriz), Lip-MANAE-bagaço foi o mais estável termicamente (45°C) e o derivado Lip-PEI-agarose foi o mais estável em etanol (30% v/v). A atividade da lipase imobilizada em MANAE-sabugo e MANAE-bagaço aumentou na presença de etanol, n-hexano e DMSO, e na presença dos surfactantes CTAB e Triton x-100. Com base nos resultados, pode-se concluir que o uso dos resíduos agro-industriais (bagaço de cana e sabugo de milho) como suporte, após serem ativados com grupos amino, é uma alternativa eficaz e de baixo custo para aplicação de lipases imobilizadas.

Palavras chave: biodiesel, imobilização, transesterificação enzimática, biocatálise, *Acremonium-like* ROG 2.1.9

Abstract

Lipases have specific catalytic activities which allow its use in different industry sectors such as food, waste water treatment, cosmetics, pharmaceuticals and biofuel. The efficiency, preservation of the biochemical properties, recovery and reuse of the activity of these enzymes are increased by immobilization on an inert support. The objective of this study was to purify partially and characterize the lipase transesterification produced by *Acremonium*-like ROG 2.1.9, and to immobilize it on different matrices, including agro industrial waste. The enzyme showed the highest activity at pH 7.0 and at 45 °C and stability in the presence of n-hexane and methanol (92% and 40%, respectively), for 24 hours. The lipase also showed specificity for medium-chain fatty acids, as *p*-nitrophenyl decanoate (C10: 0), followed by *p*-nitrophenyl palmitate (C16: 0). The enzyme was partially purified by fractional precipitation with ammonium sulfate, with higher yield in the range of 30-50% salt saturation. The partially purified lipase was immobilized by adsorption on sugarcane bagasse and on corn cob, through hydrophobic interaction on Sepabeads C18, Lewatit 105 and Lewatit 1600; by ionic interaction on PEI-agarose, MANAE-corn cobs and MANAE- cane bagasse and by multipoint covalent bond on Glyoxyl-cob corn and Glyoxyl-cane bagasse. The immobilization by ionic interaction on MANAE-cob afforded an increase of 100% in the activity of enzyme. The Lip-MANAE-cob derivative showed higher ionic strength, Lip-MANAE-bagasse was more stable thermally (45 °C) and Lip-PEI-agarose derivative was the most stable in ethanol (30% v / v). The activity of the MANAE-cob and MANAE-bagasse derivatives increased in the presence of ethanol, n-hexane and DMSO and in the presence of surfactants CTAB and Triton X-100. Based on the results, it was concluded that the use of agro-industrial waste (bagasse and corn cob) as support, after activation with amino groups, is an effective and inexpensive alternative for the application of immobilized lipases.

Keywords: Biodiesel, *Acremonium*-like ROG 2.1.9, enzymatic transesterification, immobilization and biocatalysts

Introdução

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres, particularmente triglicerídeos de cadeias longas, que produzem ácidos graxos livres, di- e monoglicerídeos, e glicerol. No entanto, em meios não-aquosos estas enzimas catalisam a esterificação, acidólise, aminólise, alcoólise, e reações de interesterificação com elevada seletividade, especificidade, e sob condições suaves (BORNSCHEUER, 2002).

A versatilidade catalítica da lipase permite sua aplicação em diversas áreas da biotecnologia industrial, incluindo a modificação de óleos e gorduras, a síntese de ésteres com propriedades de sabor e aroma, a isomerização de compostos farmacêuticos e a produção de ésteres alquílicos, o biodiesel.

Quando imobilizadas em um suporte adequado, as lipases podem ser facilmente separadas do produto final e reutilizadas em uma nova reação, o que reduz custos e otimiza o processo industrial, além disso a enzima imobilizada pode apresentar melhor rendimento de catálise e maior estabilidade frente a determinadas condições, como altas temperaturas e presença de solventes.

Algumas das técnicas mais empregadas para imobilização de lipases é por adsorção física ou iônica (interação hidrofóbica e iônica), por ligação covalente multipontual e por encapsulamento. O método ideal vai depender das características estruturais de cada lipase e do suporte utilizado.

Considerando o alto preço das lipases comerciais imobilizadas, devido principalmente ao tipo de suporte utilizado, e a inviabilidade de sua aplicação em grande escala na produção do biodiesel, muitos pesquisadores estão buscando novos materiais de baixo custo e biodegradáveis para imobilizar lipases, como alguns materiais lignocelulósicos e bio-polímeros.

Diante disso, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar diferentes suportes e protocolos de imobilização, incluindo resíduos agro-industriais (bagaço de cana e sabugo de milho) com o intuito de obter derivados de baixo custo e com eficiente capacidade catalítica.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

Lipases

As lipases (triacilglicerol lipase EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a clivagem de ligações ésteres carboxílicos, em meio aquoso, e as reações de síntese, em meio com mínima quantidade de água, como a transesterificação (acidólise e acoólise), interesterificação, aminólise e a esterificação (BORNSCHEUER, 2002; SHARMA; CHISTI E BANERJEE, 2001; HOUDE, KADEMI e LEBLANC, 2004; RIGO et al. 2010).

Todas as lipases são constituídas por folhas β e α -hélice e um sítio ativo formado por uma tríade catalítica composta por Ser-His-Asp/Glu (Figura 1) (HOU e SHIMADA, 2009; ERICSSON et. al, 2008; BORNSCHEUER, 2002; SECUNDO et al., 2006). Muitas delas apresentam uma estrutura hidrofóbica α helicoidal que encobre o sítio ativo, denominada tampa ou “lid”, que é responsável pelo mecanismo de ativação interfacial, ou seja, quando em contato com o substrato em uma interface lipídio/água, tem sua conformação alterada, movendo-se e expondo o sítio catalítico (JAGER e REETZ, 1998; PLEISS et al., 2000; BORNSCHEUER, 2002). Uma família de lipase I.3 produzida por *Pseudomonas* sp. MIS38 apresenta dois Lids (Lid 1 e Lid 2), o Lid 1 já conhecido para estas bactérias e o Lid 2 encontrado somente neste isolado e em outras famílias I.3 de lipases, sendo que a ativação interfacial foi dependente da presença do Lid 2, ou seja, a capacidade catalítica da enzima era satisfatória na presença das duas estruturas (Figura 2) (CHENG et al., 2012).

As lipases são produzidas por plantas, animais e microorganismos. Nos vegetais, essas enzimas estão presentes principalmente em sementes oleaginosas, como a mamona (EASTMOND, 2004) e sementes de palma (*Jatropha curcas* L.) (ABIGOR et al., 2002); nos animais, as lipases mais estudadas até hoje são aquelas advindas do pâncreas de porco e de humanos, as quais estão envolvidas em diversas etapas do metabolismo de lipídios (RIBEIRO et al., 2011). Apesar da grande variedade de fontes de lipases, as de origem microbiana são consideradas as mais promissoras como biocatalisadores industriais porque frequentemente apresentam boa estabilidade, são ativas em uma ampla variedade de solventes orgânicos, não precisam de co-fatores (BORNSCHEUER et al., 2002) e requerem procedimentos mais simples de extração por serem, na maioria dos casos, secretadas no meio (CARVALHO et al., 2003;

SHRIMHAN et al., 2011). Os microrganismos ainda podem ser facilmente manipulados geneticamente permitindo obter linhagens hiperprodutoras, que não sofrem influência de flutuações sazonais e podem crescer em meios de baixo custo (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006).

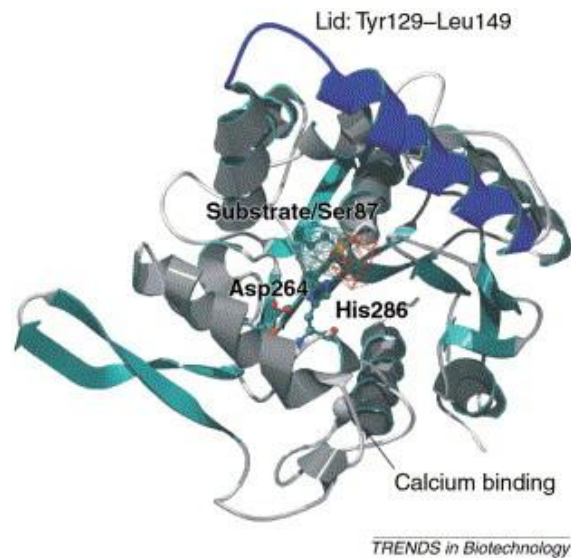


Figura 1. Estrutura da lipase de *Pseudomonas glumae* na conformação aberta com um substrato ligado. O sítio ativo consiste de Ser87, Asp264 e His286. A estrutura está estabilizada pela ligação de um íon cálcio. (BORNSCHEUER et al., 2002)

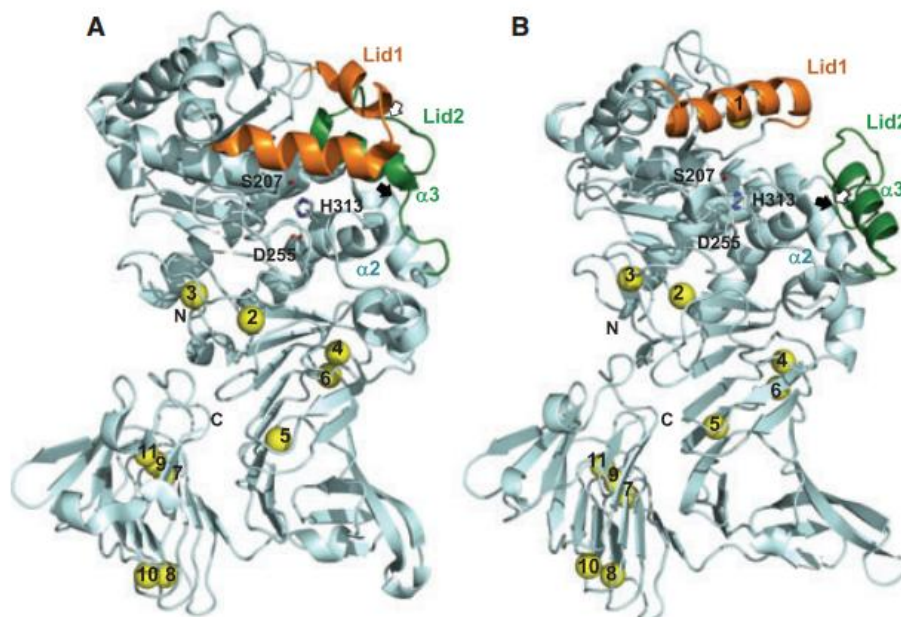


Figura 2. Estrutura em cristal da lipase de *Pseudomonas* sp. MIS38 indicando os dois Lids (Lid 1 e Lid 2) na conformação fechada (A) e na conformação aberta (B). O Lid 1 está indicado na cor alaranjada, o Lid 2 na cor verde. Os íons cálcio estão indicados como esferas amarela. (CHENG et al., 2012)

Em relação à especificidade pelos substratos, as lipases podem ser específicas para o tamanho da cadeia de carbono dos ácidos graxos (AG), e para o número e posições das insaturações. Também podem ser específicas quanto à posição da ligação éster na cadeia de triacilglicerol (TAG), sendo que algumas atuam especificamente nas posições 1, 3 do TAG, enquanto outras, hidrolisam preferencialmente ligações éster na posição 2 do TAG. Outras lipases reconhecem aleatoriamente todas as ligações éster do TAGs (HOU e SHIMADA, 2009; BORNSCHEUER, 2002; PAQUES e MACEDO, 2006).

Nas reações de transesterificação e esterificação as lipases ainda podem apresentar especificidade pelos álcoois com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, que variam desde o metanol (C1) até o dodecanol (C12), embora outros fatores, como a temperatura, o tipo de solvente e outros componentes do meio reacional e a estrutura e dinâmica molecular das lipases, possam interferir nessas seletividades (VAYSSE et al., 2002; BEZBRADICA et al., 2006).

Imobilização de lipases

Um dos fatores que limitam o uso de lipases livres em processos industriais, assim como na produção do biodiesel é a impossibilidade de recuperação e reutilização destas, o que eleva o custo final do produto. Uma vez que o preço desse catalisador no mercado ainda é muito alto, considerando o valor do biodiesel, é necessário que a lipase seja ligada a uma matriz sólida (imobilizada), o que permitiria sua separação no final do processo com recuperação e reuso, e melhoraria suas propriedades catalíticas, como por exemplo, sua estabilidade térmica (GUISÀN; 2006).

Por definição, enzimas imobilizadas são aquelas fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região definida do espaço com retenção de sua atividade catalítica e que pode ser usada repetidamente e continuamente (JEGANNATHAN; ABANG, 2008).

Diversas técnicas são empregadas para a imobilização de lipases, dentre elas a adsorção (física ou iônica), a ligação da enzima em um material insolúvel por meio de pontes de ligação cruzada com a proteína que é desenvolvida com uso de um reagente

específico e o confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou por encapsulação (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Imobilização por adsorção

A imobilização por adsorção a um suporte é uma técnica simples e pode ser física (interação hidrofóbica ou van der Waals) ou iônica, no entanto, é importante que a força da interação seja forte o bastante para que a enzima não se solte do suporte e se misture ao produto da reação, especialmente durante processos industriais (SHELDON; PELT, 2013). Entretanto, não apenas a natureza química do suporte, mas também a forma como a enzima se liga a ele (ativa ou não), o tamanho da partícula, sua porosidade e sua área superficial afetam este tipo de imobilização (GITLESEN, BAUER; ADLERCREUTZ, 1997; AL-DURI; YONG, 2000).

O princípio de imobilização por interação hidrofóbica (Figura 3A) está relacionado com a capacidade da enzima de reconhecer o suporte como um substrato, uma vez que na presença de uma interface hidrofóbica as lipases atuam por meio da ativação interfacial, mantendo seu sítio ativo aberto, o que facilita o acesso do substrato (ou grupo hidrofóbico presente no suporte), melhorando assim sua atividade (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002).

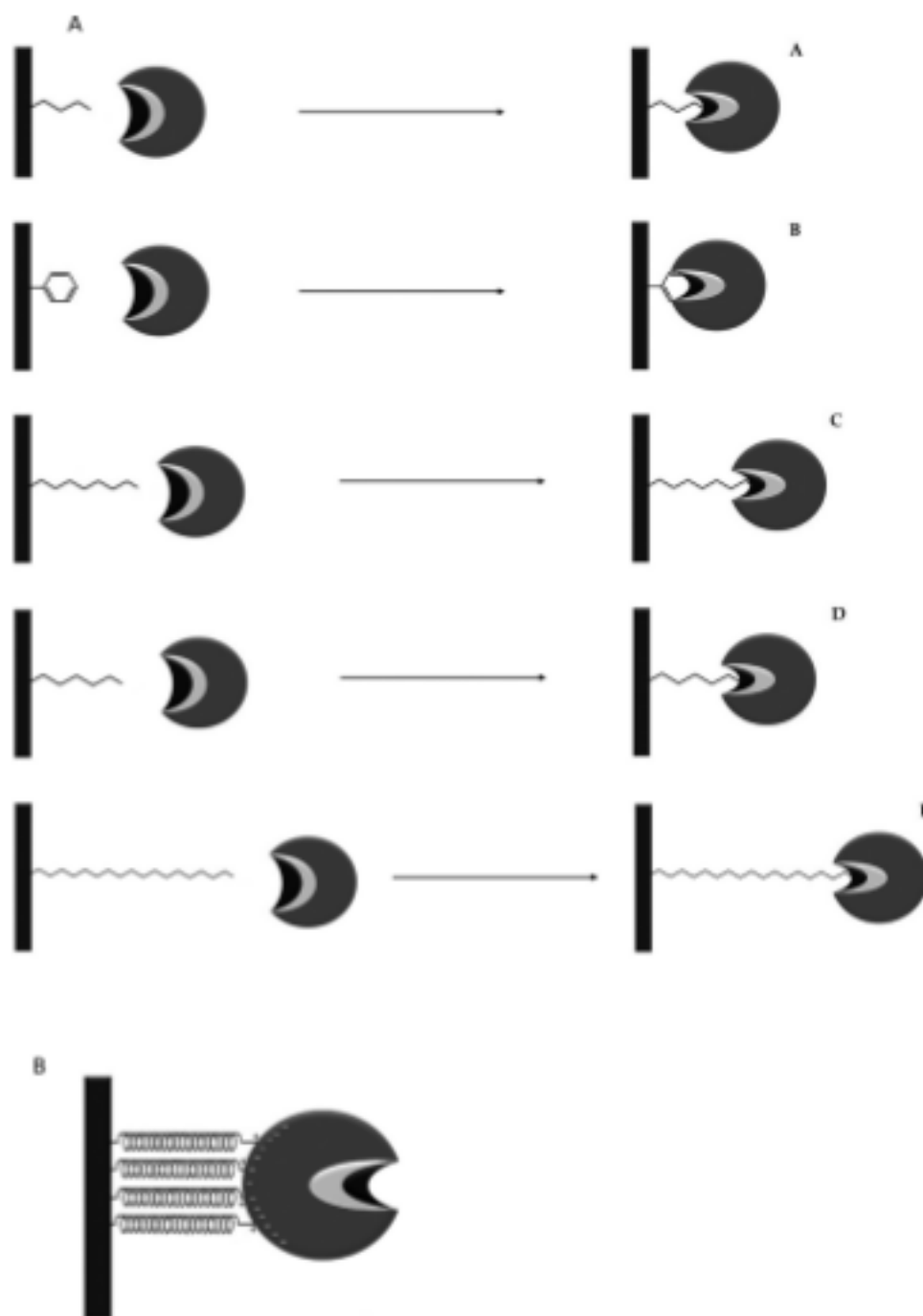


Figura 3. Formas de imobilização por adsorção simples. (A) Imobilizações hidrofóbicas A. Butil-Sepharose, B. Phenil-Sepharose, C. Hexyl-Toyopearl, D. Octil-Sepharose, E. Decaoctil Sepabeads. (B) Imobilização iônica. (PEREIRA et al., 2015)

Algumas resinas hidrofóbicas, como Octil-Sepharose, divinilbenzeno-estireno, Butil-agarose, Hexil-toyopearl, Octadecil-Sepabeads e Immobead 150 podem ser empregadas como suportes na imobilização de lipases (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; WILSON et al., 2006; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008; MATTE et al., 2014), aumentando, em muitos casos, sua capacidade catalítica, contudo, elevando os

custos do derivado, como é o caso da lipase comercial Novozyme 435 que é a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada na resina polimérica acrílica macroporosa Lewatit VP OC 1600, comercializada pela Novozymes. Porém, apesar do alto custo dessas resinas, quando o interesse é obter produtos de alto valor agregado, como insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas de alta pureza (HABIBI, MOHAMMADI; YOUSEFI, 2013) ou o enriquecimento de ácidos graxos poli-insaturados (YAN et al., 2011), o uso destes suportes pode ser viável e por isso ainda é alvo de estudos.

Pizarro et al. (2012) imobilizaram a lipase de *Candida cylindracea* em octil-agarose nativa (adsorção hidrofóbica) e modificada com polímeros funcionais (ligação cruzada) para obtenção de derivados estáveis na síntese de ômega 3 a partir de óleo de peixe. A estabilização da forma aberta das lipases de *Thermomyces lanuginosus* e *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em octil-agarose foi avaliada por Manoel et al. (2015).

A adsorção de enzimas em suportes com cargas iônicas (principalmente aniônica) é a mais comum e mais simples (GIRELLI; MATTEI, 2005) e envolve a interação entre as cargas presentes na superfície da enzima e as cargas do suporte (Figura 3). Suportes rígidos e porosos envolvidos por polímeros flexíveis contendo alta densidade de íons, como por exemplo, suportes cobertos por polietilenoimina (PEI), sulfato dextrana ou etilenodiamina (MANAE) é considerado um método adequado para imobilização de proteínas de forma reversível, porém, forte (FUENTES et al., 2004; FILHO et al., 2008; MATEO et al., 2000). Além disso, resinas de troca iônica, como Duolite, Carboximetil celulose (CMC), DEAE-Sepharose e Q-Sepharose, também podem ser utilizadas como suporte para imobilização de enzimas, como β -Galactosidases e lipases (GUIDINI et al., 2010; PEREIRA et al., 2015; FUENTES et al., 2004).

Imobilização Covalente

A imobilização por ligação covalente multipontual em suportes previamente ativados utiliza braços moleculares ligados ao suporte que permitem a orientação da enzima através dos diferentes resíduos de aminoácidos de sua superfície, sendo que as diferentes formas de ativação do suporte é que vão determinar por quais resíduos as

enzimas serão imobilizadas (GUISÁN et al., 1997). Essa técnica tem a vantagem de permitir uma ligação forte e irreversível entre as enzimas e o suporte, sendo bastante atrativa para a estabilização e resistência destas em processos industriais, que muitas vezes exigem uso contínuo dos biocatalisadores e apresentam condições que podem alterar suas estruturas, como por exemplo, o calor e os solventes orgânicos (GUISÁN, 2006).

A imobilização em suportes ativados com glioxil (Figura 4) forma várias ligações covalentes entre grupos aminos desprotonados de resíduos de lisina de uma molécula de enzima, grupos carboxílicos e os grupos aldeídos alifáticos lineares, moderadamente afastados da superfície do suporte (grupos glioxil), e os reagentes mais utilizados na formação desses suportes são o glicidol e a epicloridrina (MENDES, 2009; MENDES et al., 2011).

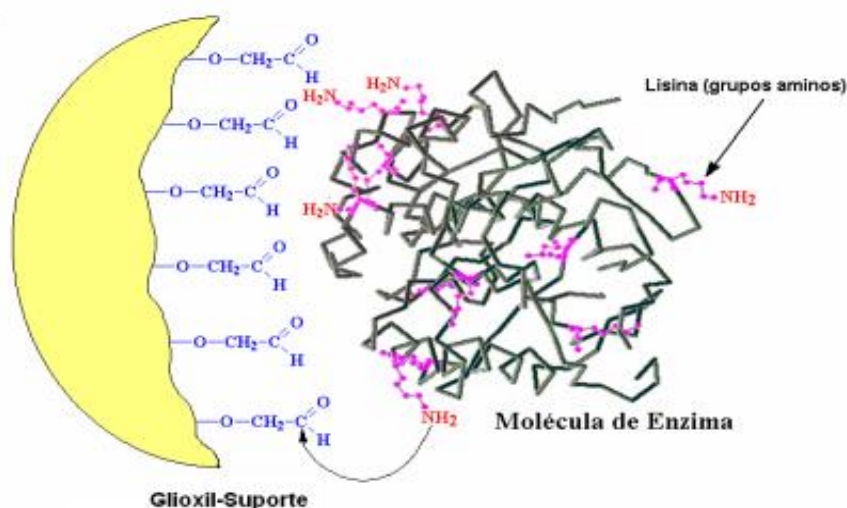


Figura 4. Esquema representativo de imobilização de enzimas em suportes glioxil (MENDES, 2009).

O glutaraldeído também é um composto químico amplamente utilizado na modificação de suportes para imobilização covalente, ele reage com grupos aminos primários e eventualmente com outros grupos (fenóis, tiois e imidazóis) (WALT e AGAYN, 1994). Comumente se utiliza suportes previamente ativados com grupos aminos, sendo que uma ou duas moléculas de glutaraldeído reage com um grupamento amino primário (BETANCOR et al., 2006), e diferentemente do suporte-glioxil, o

suporte ativado com glutaraldeído fornece grupos aldeídos mais afastados do suporte (Figura 5).

Diferentes suportes podem ser ativados para a imobilização de enzimas por ligação covalente multipontual, dentre eles o gel agarose (MATEO et al., 2006), Lewatit VP OC1600 (RODRIGUES et al., 2010), octil-agarose (RUEDA et al., 2015), a resina Toiopearl (MENDES et al., 2011) e a quitosana (SILVA et al., 2012).

Alguns suportes também podem ser ativados com outros grupos, como as nanopartículas de sílica ativadas com grupos epoxi reportada recentemente por Ashjari, Mohammadi e Badri (2015), para a imobilização covalente multipontual da lipase de *Rhizopus oryzae*, aminada e não-aminada, e as microesferas de polivinil acetato-acrilamida, também ativadas com grupo epóxi por Zhang et al. (2015), para imobilização covalente da lipase de *Candida rugosa*.

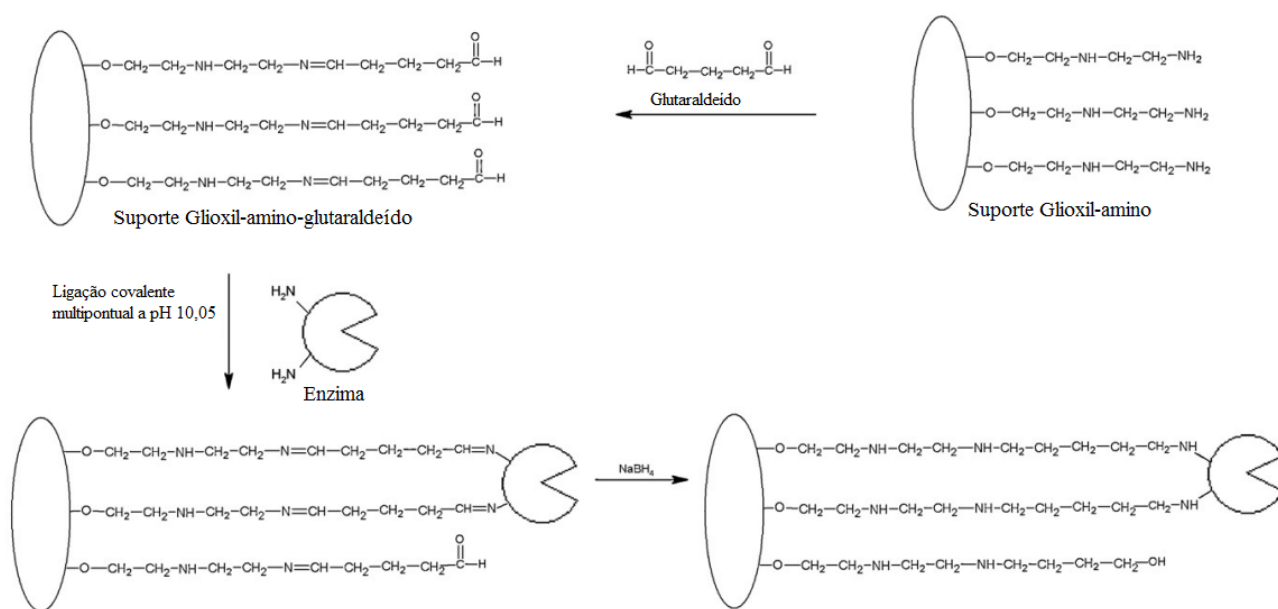


Figura 5. Mecanismo de ligação covalente multipontual de enzimas em suporte glioxil-amino-glutaraldeído. Adaptado de Mendes et al. (2011).

Suportes alternativos e de baixo custo

O tipo de suporte usado para a imobilização, o processo químico de conjugação, as condições de ligação e o meio de reação têm efeitos complexos sobre a atividade da enzima para um substrato específico, portanto, as lipases imobilizadas mais bem sucedidas apresentam um custo muito alto, limitando suas aplicações nas reações de síntese em larga escala (PETKAR et al., 2006).

Os suportes considerados ideais devem ser encontrados em abundância e com facilidade, ter baixo custo e resultar em baixo custo de imobilização, não ser tóxico e apresentar alta capacidade de retenção e resistência mecânica (PRADELLA, 2014). Atendendo a estes requisitos os resíduos agroindustriais podem ser empregados como matrizes na imobilização de enzimas e alguns trabalhos já mostram isso, como a fibra de côco verde, utilizada como suporte na imobilização de lipase por meio de adsorção (BRIGIDA et al., 2008), a casca de arroz, empregada na imobilização de invertase mediante adsorção seguida de ativação com glutaraldeído (SOUZA; GODBOLE, 2002), a palha de arroz ativada com glutaraldeído, na qual lipases microbianas foram imobilizadas e posteriormente aplicadas em reações de esterificação e hidrólise (CASTRO, LIMA, ROBERTO, 2001), e o bagaço de óleo de oliva usado como um suporte na imobilização de lipase e aplicação na síntese do biodiesel (YUCEL, 2011).

Outros trabalhos mais recentes também mostram a busca por suportes mais sustentáveis, como a pectina extraída do fruto de lobeira, que foi utilizada como suporte na imobilização de lipase por adsorção e ligação covalente via glutaraldeído (DA SILVA FILHO et al., 2012). Outros resíduos também podem apresentar grande potencial como suporte para enzimas, assim como o bagaço de cana-de-açúcar e o sabugo de milho, que são compostos por fibras lignocelulósicas (celulose, hemicelulose e lignina), as quais apresentam grupos hidroxilas acessíveis que podem reagir com outros grupos funcionais polares, além de características hidrofóbicas fornecidas pela lignina (GELLERSTEDT e GATENHOLM, 1999; PARK et al., 2015). Estas características possibilitam o uso desse material como suporte na imobilização da lipase, pois as hidroxilas livres reativas podem formar braços químicos com um ativador, como o glioxil e o glutaraldeído, permitindo assim a ligação covalente da enzima ao suporte.

Ittratt et al. (2014) avaliaram seis resíduos agroindustriais (sabugo de milho, casca de arroz, o talo da bananeira, folhas de palmeira, casca de coco e a haste de

Salacca wallichian, uma palmeira comum na Ásia) como suportes para imobilizar, por adsorção, a lipase de *Acinetobacter baylyi*.

Ainda baseado na composição destes resíduos, Park et al. (2015) produziram grânulos de hidrogéis compostos por celulose e lignina, em diferentes proporções, para avaliar a imobilização da lipase de *Candida rugosa* e constatou que a atividade e a estabilidade da enzima aumentaram proporcionalmente ao aumento do teor de lignina no hidrogel.

Além dos materiais lignocelulósicos, outro material biológico vem sendo utilizado em imobilizações de lipases por adsorção física, é o biopolímero poli-hidróxibutirato (PHB) (MENDES et al., 2012). Ele é um poliéster produzido por bactérias como reserva de energia e que apresenta características hidrofóbicas, além de ser biocompatível e biodegradável (ZHIJIANG et al., 2016). Ramos e colaboradores (2015) utilizaram o PHB na imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* e obtiveram bons resultados em reações de hidrólise e esterificação.

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes suportes e protocolos de imobilização da lipase produzida pelo fungo *Acremonium*-like ROG 2.1.9, utilizando resíduos agro-industriais (bagaço de cana e sabugo de milho) com o intuito de obter derivados de baixo custo e com eficiente capacidade catalítica.

2.2. Específicos

- Produção da lipase pelo fungo *Acremonium*-like ROG 2.1.9. por FES;
- avaliação dos efeitos do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da lipase em sua forma bruta;
- purificação parcial da lipase e imobilização em diferentes suportes por meio de adsorção e ligação covalente multipontual;
- avaliação da estabilidade térmica e da estabilidade da enzima imobilizada em presença de etanol, solventes e surfactantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos

Foi utilizado neste trabalho, o fungo *Acremonium-like* ROG 2.1.9, isolado de resíduo de caixa de gordura doméstica (Brito, 2012) e que faz parte da coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE / UNESP, São José do Rio Preto-SP.

3.2. Obtenção das enzimas por FES

Para a obtenção das enzimas por FES (Fermentação em estado sólido), o fungo foi cultivado em 10 g de substrato sólido em embalagens de polipropileno (26,5 cm x 15 cm). O substrato sólido consistiu de mistura de bagaço de cana de açúcar e farelo de soja (1:1) adicionada de uma solução nutriente composta por 2% de peptona de caseína, 0,2% K_2HPO_4 , 0,05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 4% de óleo de canola (Brito, 2012).

O substrato foi inoculado com suspensões de esporos obtidas de culturas de 4 dias em concentração de 10^7 esporos $\cdot g^{-1}$ substrato. O material inoculado foi incubado em estufa a 30 °C, por 3 dias. Após esse período, foram adicionados 100 mL de tampão fosfato de sódio a 0,05 M, pH 7 contendo 0,01% de triron-x100. Após homogeneização, a mistura foi agitada por 30 minutos em shaker, a 100 rpm. O material foi então filtrado e centrifugado a 10000x g, por 15 min, a 5 °C, e o sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta.

3.3. Dosagem da atividade enzimática

3.3.1. Atividade hidrolítica usando *p*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP) como substrato.

A atividade da lipase foi determinada com base na hidrólise de *p*-NPP segundo o método modificado de Krieger (1995). O substrato foi preparado pela mistura de 3mg de pNPP dissolvido em 1,0 mL de isopropanol (2-propanol) com 9,0 mL de tampão fosfato (50mM, pH 7) contendo 0,4% (m .v⁻¹) de Triton x-100 e 0,1% (m .v⁻¹) de goma arábica. A reação foi conduzida pela adição de 0,1 mL do extrato enzimático brutaem 0,9 mL de substrato e medida a absorbância a 410 nm. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1μmol of *p*-nitrophenol.mL.min⁻¹ a 35 °C.

3.3.2. Atividade hidrolítica usando *p*-nitrofenol butirato (*p*-NPB) como substrato

Este ensaio foi realizado medindo-se o aumento da absorbância a 348 nm decorrente da liberação de *p*-nitrofenol na hidrólise do *p*-NPB (a 0,4 mM em tampão fosfato 25 mM), a pH 7,0 e 25°C. A reação foi feita diretamente em espectrofotômetro sob agitação magnética contínua e controle de temperatura. Para a reação foram adicionados 0,02 mL de substrato (*p*-NPB dissolvido em acetonitrila), 2,5 mL de tampão fosfato 25mM a pH 7,0 e em seguida, 0,1 mL do extrato bruto enzimático do derivado (enzima e suporte) .

3.3. Determinação dos teores de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais das soluções enzimáticas brutas e fracionada foi feita através do método de Bradford (1976), usando soroalbumina bovina como padrão.

3.4. Concentração da solução de enzima.

A solução de enzima bruta obtida pela suspensão filtrada do meio de cultivo, foi concentrada cerca de 10 vezes por ultrafiltração utilizando o sistema "QuixStandTM benchtop" da Amershan Bioscience com membrana com miliporos de corte de 10 kDa. Para os testes de imobilização, o extrato concentrado foi precipitado com sulfato de amônio como primeiro passo de purificação.

3.5. Precipitação da enzima com Sulfato de amônio.

Primeiramente foi realizado um teste de precipitação fracionada com sulfato de amônio, em que foram avaliadas as concentrações de 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60% e 60-80% (m v⁻¹) de saturação do sal.

O sulfato de amônio foi adicionado lentamente a 20 mL da solução enzimática gelada, que foi mantida sob agitação magnética por 30 minutos a 5 °C em câmara fria. Após completa solubilização, a amostra foi centrifugada a 10000 g por 30 minutos a 5°C. O precipitado foi ressuspendido no mesmo volume inicial e ao sobrenadante foi adicionada a quantidade de sal necessária para atingir a concentração de sal da etapa seguinte, de acordo com a tabela (Tabela 1) apresentada por Green e Hughes (1955).

Cada fração precipitada e seus respectivos sobrenadantes foram dialisados contra tampão fosfato 25mM pH 7,0 por 24 horas a 4°C com trocas sucessivas de tampão.

Tabela 1. Concentrações iniciais e finais de sulfato de amônio para precipitação de enzimas

		Gramas de sulfato de amônio / litro de solução															
		Concentração final de sulfato de amônio, saturação (%)															
		10	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90	100
Concentração inicial de sulfato de amônio, saturação (%)	00	56	114	114	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561	662	767
	10		57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
	20			29	59	91	123	155	188	222	257	293	340	388	438	520	611
	25				30	61	93	125	158	192	228	265	303	342	393	480	583
	30					30	62	94	126	160	196	233	271	310	362	452	557
	35						31	63	94	127	161	198	236	275	328	421	528
	40							31	63	97	132	168	206	245	299	395	499
	45								32	65	99	134	172	211	266	365	471
	50									33	66	101	136	175	221	322	430
	55										33	67	103	138	177	279	389
	60											34	69	105	140	283	404
	65												34	70	107	290	421
	70													35	72	300	439
	75														36	311	458
	80															77	157
	90																79

O cálculo do rendimento foi feito segundo a equação a seguir:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{Atividade total da fração} / \text{Atividade total do extrato bruto}) * 100$$

3.6. Caracterização parcial da lipase bruta

Nesta etapa do trabalho foi utilizada solução enzimática bruta concentrada cerca de 10 vezes por ultrafiltração utilizando o sistema QuixStand™ benchtop da Amersham Bioscience com membrana com miliporos de 10 kDa.

3.6.1. Efeitos da temperatura e pH sobre a atividade e estabilidade da enzima bruta

Os valores de pH avaliados foram 3, 4 e 5 (tampão acetato 100 mM), 6, 7 e 8 (tampão fosfato 100 mM), 9 e 10 (glicina-NaOH 100 mM). O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi avaliado medindo-se as atividades hidrolíticas nas temperaturas entre 25 – 50 °C.

A estabilidade da enzima frente à variação do pH do meio, quando em ausência de substrato, foi determinada incubando-se a solução enzimática diluída em tampões com pHs 5, 7 e 10, a 25 °C. A estabilidade térmica das enzimas foi determinada por incubação da solução enzimática em banho nas temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50 °C. As amostras de cada teste foram coletadas ao tempo zero e após 24 horas de incubação e a atividade hidrolítica foi determinada na temperatura e pH definidos como melhores para a atividade da enzima. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.6.2. Estabilidade da enzima durante estocagem sob diferentes temperaturas

A solução enzimática bruta foi estocada a -20 °C, 4 °C e em temperatura ambiente por 35 dias, sendo as atividades hidrolíticas determinadas a cada 7 dias de armazenamento.

3.6.3. Estabilidade da enzima em presença de diferentes solventes orgânicos.

A estabilidade da enzima na presença de diferentes solventes orgânicos foi estudada incubando-se a solução enzimática diluída em n-hexano, acetona, n-butilíco, metanol, isopropanol, etanol e terc-butanol (50% v/v), sob agitação, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A atividade remanescente foi determinada em pH 7 a 45 °C.

3.6.4. Especificidade da enzima por diferentes substratos.

Diferentes substratos cromogênicos (ésteres de *p*-nitrofenila) foram usados para avaliar uma possível preferência da lipase por diferentes substratos em função do tamanho da cadeia carbônica. Foram testados *p*-nitrofenil butirato (C4:0), *p*-nitrofenil decanoato (C10:0), *p*-nitrofenil laurato (C12:0) e *p*-nitrofenil palmitato (C16:0). Nesses ensaios as dosagens das atividades foram realizadas pelo método espectrofotométrico, como descrito anteriormente, em pH 7 a 45 °C.

3.7. Imobilização da lipase em diferentes suportes.

3.7.1. Suportes utilizados

Foram avaliados 3 métodos diferentes de imobilização (interação iônica, interação hidrofóbica e ligação covalente), com 10 suportes distintos: PEI-agarose (agarose revestida com polietilenoimina), MANAE (Monoaminoetil- N- aminoetil)-sabugo, MANAE (Monoaminoetil- N- aminoetil)-bagaço, bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, Sepabeads C18, Lewatite 1600, Lewatite 105, Glioxil-bagaço e Glioxil-sabugo.

3.7.1.1. Preparo dos materiais lignocelulósicos como suportes para imobilização da enzima.

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Açucareira Virgolino S/A de José Bonifácio/SP e o sabugo de milho foi coletado em plantação na região de São José do Rio Preto. Esses materiais foram lavados, secos em estufa com circulação de ar a 60 °C, triturados e tamisados em malhas de 125 mesh. O pó fino obtido foi tratado com glicidol e etilenodiamina descrito a seguir.

Para expandir os materiais lignocelulósicos (pó de sabugo de milho e de bagaço de cana) e assim aumentar a superfície de contato, estes suportes foram submetidos à autoclavagem por 15 minutos a 120°C em presença de álcool 70%. Após desligar a autoclave, a válvula foi aberta rapidamente para a saída do vapor e consequente queda abrupta na pressão interna da autoclave levando a expansão das partículas. Após este procedimento, os materiais foram filtrados a vácuo e armazenados a 4°C antes da continuidade do preparo.

A preparação deste suporte envolveu duas etapas: ativação e oxidação a aldeídos (Figura 6). Os suportes foram ativados seguindo o protocolo usado para o suporte agarose, descrito por Guisán (1988). A uma alíquota de cada resíduo, em banho de gelo, foram adicionados água destilada, NaOH 1,7mol L⁻¹ (gelado), NaBH₄ (boroidreto de sódio) e, sob agitação suave, glicidol (2,3-epóxi-1-propanol). 10 g desses gliceril-suportes ativados via glicidol (bagaço de cana ou sabugo de milho), foram suspensos em 100 mL de água destilada e adicionados 100 µM de periodato de sódio por grama. A

oxidação foi mantida sob suave agitação por 2 h a 25 °C. Em seguida, os suportes ativados (glioxil-suportes) foram lavados exaustivamente com água bidestilada, filtrados a vácuo e estocados sob refrigeração.

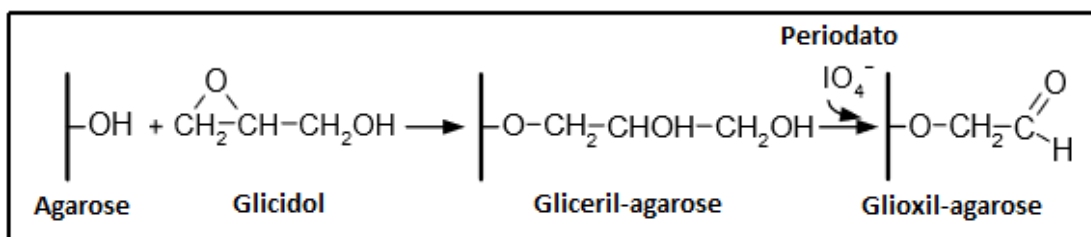


Figura 6. Esquema representativo da preparação de um suporte-glioxil.

3.7.1.2. Preparação de MANAE (monoaminoetil- N – aminoetil) suportes a partir de materiais lignocelulósicos ligados ao grupo Glioxil

Este suporte consiste em uma matriz coberta por grupos aminos que permite a imobilização da enzima por interação destes com os grupos carboxilas dos aminoácidos (Figura 7). Inicialmente, 40 mL de solução de etilenodiamina (EDA) a 2 M, pH 10,0 foram adicionados a 10 g de glioxil-suportes ativados com glicidol (glioxil-bagaço de cana e glioxil-sabugo de milho) e mantido sob agitação por 2 horas. Em seguida, 0,57 g de NaBH₄ foram adicionados ao sistema que foi mantido por 2 horas sob agitação branda em frasco aberto, à temperatura ambiente. Os suportes glioxil-amino- (MANAE) obtidos foram lavados exaustivamente com água destilada, filtrados a vácuo e estocados sob refrigeração.

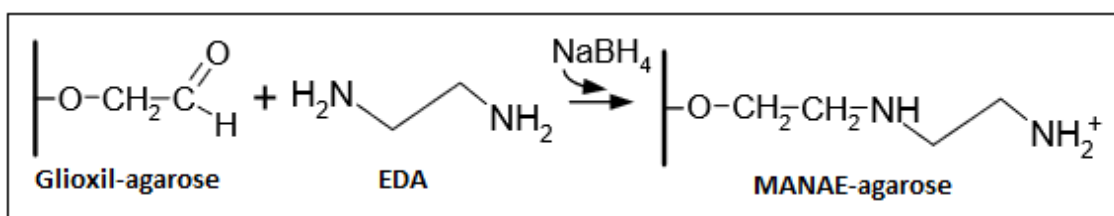


Figura 7. Esquema representativo da preparação do Suporte-glioxil-MANAE

Os suportes Sepabeads C18, Lewatite 1600 e Lewatite 105 foram cedidos pelo Departamento de Biocatálisis do Instituto de Catalisis e Petroleoquímica coordenado pelo Prof Dr. José Manuel Guisán, localizado na Universidade Autónoma de Madri/ES.

3.8. Preparo dos derivados (enzima imobilizada).

3.8.1. Imobilização reversível.

O método inclui adsorção hidrofóbica em Sepabeads C18, Lewatit 1600 e Lewatit 105, e imobilização por interação iônica em PEI-agarose, MANAE-bagaço, MANAE-sabugo, bagaço de cana e sabugo de milho. A solução enzimática foi diluída em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 e adicionada ao suporte numa relação 1:10 (suporte:solução enzimática). A suspensão foi mantida sob agitação mecânica a 25°C e o curso da imobilização foi acompanhada com a medição da atividade (3.3.2) do sobrenadante em períodos definidos até 24 horas.

3.8.2. Imobilização irreversível.

Este método inclui a imobilização por ligação covalente multipontual em Glioxil-bagaço e Glioxil-sabugo. A solução enzimática foi diluída em tampão bicarbonato 100 mM pH 10,0 e adicionada ao suporte em uma proporção 1:10. A suspensão foi mantida sob agitação mecânica a 25°C e o curso da imobilização foi acompanhada com a medição da atividade (item 3.3.2) do sobrenadante em períodos definidos até 24 horas. Após 24 horas de imobilização foi retirada uma alíquota do sobrenadante para medir a quantidade de proteína e foi adicionado à suspensão, o boroidreto de sódio (1mg/g de suporte) e mantido sob agitação por mais 30 minutos. Ao final, o derivado foi filtrado e lavado com água bidestilada.

3.8.3. Avaliação da eficiência da imobilização da enzima

A eficiência de imobilização é a relação entre a quantidade de enzima imobilizada e a quantidade de enzima oferecida na imobilização. A concentração de proteína imobilizada (PI) foi quantificada com base na concentração de proteína inicialmente oferecida e a concentração de proteína residual presente no sobrenadante após a imobilização. A atividade recuperada (AR) foi determinada pela relação entre a atividade hidrolítica dos derivados (AHder.) e a atividade desaparecida no sobrenadante após a imobilização.

3.8.4. Dessorsão da lipase de suportes hidrofóbicos.

Os derivados (0,3 g) obtidos a partir da imobilização da enzima em suportes hidrofóbicos (Sepabeads C18, Lewatit 1600 e Lewatit 105) foram suspensos em 3 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 ao qual foram adicionadas concentrações crescentes de triton x-100 (0,1-1%) e mantidas sob agitação mecânica em temperatura ambiente. Amostras foram retiradas do sobrenadante a cada 45 minutos para medir a atividade e acompanhar a liberação da enzima.

3.8.5. Dessorsão da lipase de suportes iônicos.

Os derivados obtidos pela imobilização da lipase em suportes iônicos (PEI-agarose, MANAE-bagaço, MANAE-sabugo, bagaço de cana e sabugo de milho) foram suspensos em 3 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0, acrescido de concentrações crescentes (0,5-1 M) de NaCl e mantidas sob agitação mecânica em temperatura ambiente. Foram retiradas amostras a cada 45 minutos para medir a atividade e acompanhar a liberação da enzima.

3.8.6. Estabilidade térmica dos derivados.

Os derivados selecionados (Lipase-PEI-agarose, Lipase-MANAE-bagaço e Lipase-MANAE-sabugo) foram suspensos em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 numa proporção 1:10 (derivado:tampão) e mantidos em banho maria a 45°C, alíquotas da suspensão foram retiradas em períodos determinados até 24 horas para medir a atividade (item 3.3.2) remanescente de cada derivado. A enzima livre diluída em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 também foi submetida ao teste de estabilidade térmica.

3.8.7. Estabilidade dos derivados em etanol.

Os derivados (Lipase-PEI-agarose, Lipase-MANAE-bagaço e Lipase-MANAE-sabugo) foram suspensos em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 com 30% de etanol anidro, numa proporção 1:10 (derivado:tampão) e mantidos em temperatura ambiente sob agitação mecânica. Alíquotas foram retiradas em períodos determinados até 24 horas para obter a atividade (item 3.3.2) remanescente de cada derivado.

3.8.8. Efeito de solventes orgânicos e surfactantes na atividade enzimática dos derivados.

Os efeitos da concentração de três solventes orgânicos (etanol, n-hexano e DMSO) e de dois surfactantes (Triton x-100 e CTAB), na atividade dos derivados Lip-PEI-agarose, Lip-MANAE-bagaço e Lip-MANAE-sabugo, foram avaliados. 0,5 g de cada derivado foram suspensos em 5 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,0 contendo de 5-30% de solventes orgânicos (etanol, n-hexano e DMSO-dimetil sulfóxido) ou de 0,05-0,7% de surfactantes (Triton x-100 e CTAB). As atividades da enzima livre e imobilizada em cada suporte avaliado, na ausência destes agentes, foi considerada como 100%. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização parcial da lipase bruta.

4.1.1. Efeito da temperatura e pH.

Os efeitos do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade lipase produzida por *Acremonium-like* ROG 2.1.9 foram avaliados, obtendo-se maior atividade a pH 7,0, com cerca de 90% da atividade mantida em pH básicos (Figura 8). Pode-se notar, no entanto, outro pico de atividade nessa curva, a pH 4,0, sugerindo que uma segunda enzima possa estar presente visto que se trata de uma solução enzimática bruta.

Na literatura são descritas lipases com atividade ótima em faixa de pH de 7 a 9, como aquelas estudadas por Rigo et al. (2010) e Dobrev et al. (2011). Pereira et al. (2013) descreveram uma lipase de *Acremonium alcalophilum* com atividade ótima a pH 8,0.

Os efeitos da temperatura sobre a atividade da lipase foram avaliados na faixa de 25 – 60°C (Figura 9). É possível observar a maior atividade a 45°C, porém, houve pouca variação na atividade da enzima quando incubada a 30, 35 ou 40°C, com mais de 90% da atividade máxima preservada.

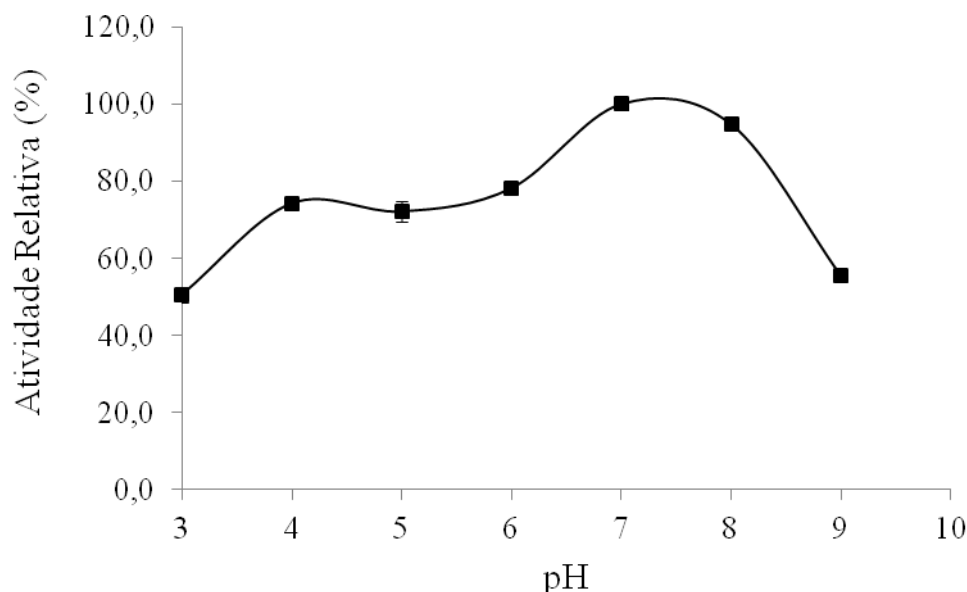


Figura 8. Efeito do pH sobre a atividade hidrolítica da lipase bruta. A atividade da lipase de *Acremonium-like* ROG 2.1.9 foi considerado como 100%.

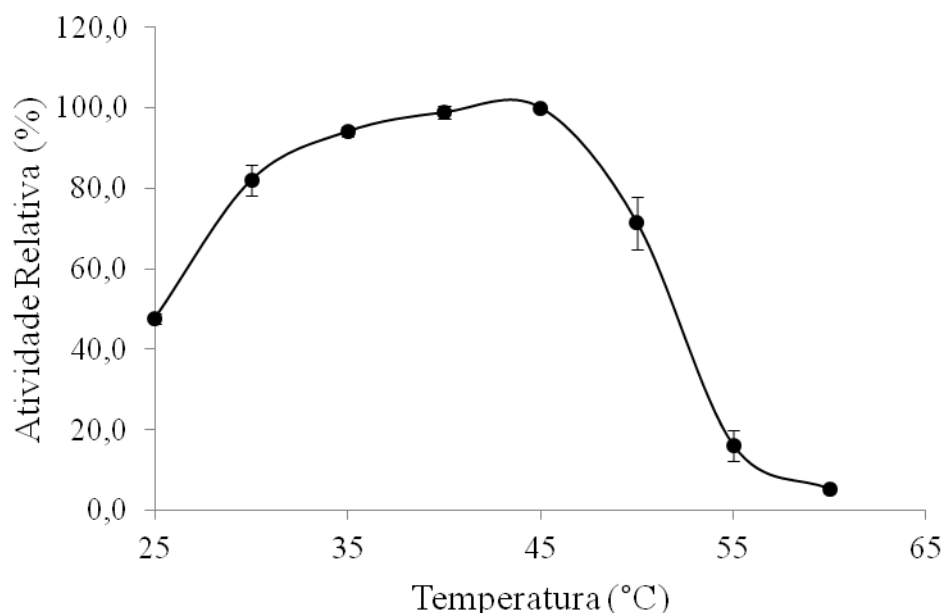


Figura 9. Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase bruta. A atividade da lipase de *Acremonium-like* ROG 2.1.9 foi considerado como 100%.

4.1.2. Estabilidade da enzima frente a variações do pH do meio quando em ausência de substrato

A estabilidade da enzima incubada em diferentes valores de pH e em ausência de substrato, foi avaliada incubando-se a solução enzimática bruta diluída em tampões com pH 5,0, 7,0 e 10,0, a 25°C. A atividade hidrolítica de cada amostra foi mensurada ao início do experimento (t_0) e após 24 horas de incubação. A enzima apresentou maior estabilidade em pH 5,0, com 100% da atividade do controle (t_0), seguido daquela incubada a pH 7,0, com 79,3 % da atividade (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos por Dheeman et al. (2011) que demonstraram que a lipase produzida por *Penicillium* SP. DS-39 (DSM 23773) em fermentação submersa, foi estável na faixa de pH 5,0 – 6,0, retraindo mais de 95% da atividade original.

Tabela 2. Influência do pH na estabilidade da atividade do extrato bruto enzimático concentrado.

pH	Atividade Residual (%)
5	100,0
7	79,3 ± 1,3
10	49,5 ± 1,8

4.1.3. Estabilidade da enzima em diferentes temperaturas de incubação, quando em ausência de substrato

A estabilidade da enzima em relação à temperatura foi avaliada mantendo-se a solução enzimática em temperaturas de 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C, em ausência de substrato, por 24h. A lipase apresentou maior estabilidade a 25 e 30°C com atividade de 100 e 88% em relação a inicial, respectivamente (Tabela 3).

Em trabalho com solução de lipase produzida por *Penicillium crustosum* em sua forma bruta e concentrada, Rigo et al. (2012) observaram maior estabilidade da mesma a 27 e 30°C. Lipase de *A. alcalophilus* estudada por Pereira et al. (2013), apresentou estabilidade entre 20 e 50°C e aquela produzida por *Rhizopus arrhizus*, relatada por Dobrev et al. (2011), que mostrou estabilidade a 40°C.

Tabela 3. Influência da temperatura na estabilidade da atividade hidrolítica do extrato bruto concentrado.

Temperatura (°C)	Atividade Residual (%)
25	100
30	90,2 ± 5,07
35	83,3 ± 9,1
40	79,8 ± 9,7
45	59,3 ± 9,7
50	59,9 ± 0,3

4.1.4. Estabilidade da lipase durante a estocagem em diferentes temperaturas

A estabilidade da enzima foi avaliada a -20, 4°C e em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), medindo-se a atividade hidrolítica a cada 7 dias durante 35 dias de estocagem. As enzimas mantiveram praticamente 100% de sua atividade durante os dias de estocagem em todas as temperaturas (Tabela 4).

Apesar da enzima não ter apresentado um perfil de atividade e termolabilidade consistentes com enzimas mesofílicas, essa resistência na estocagem parecem típicas de enzimas termofílicas (Gomes et al., 2006). Essa característica de tolerância a estocagem em temperatura em torno de 25°C é bastante interessante do ponto de vista da aplicação industrial, pois não requer instalações com baixas temperaturas de refrigeração.

Tabela 4. Estabilidade da lipase estocada em diferentes temperaturas.

Atividade remanescente da lipase (%)			
Tempo (dias)	Temperaturas		
	$\pm 25^\circ\text{C}$	4°C	-20°C
0	100	100	100
7	100	100	100
14	$90 \pm 0,9$	100	100
21	$88 \pm 1,2$	$90 \pm 1,2$	100
35	$86 \pm 0,8$	$90 \pm 0,7$	$90 \pm 0,9$

4.1.5. Efeito de solventes orgânicos na estabilidade da lipase.

Conforme mostra a tabela 5, a lipase em sua forma bruta apresentou maior estabilidade em n-hexano, com 92,8% de atividade residual, enquanto que perdeu mais de 60% da atividade quando em presença dos demais solventes. Esses resultados indicam que o extrato enzimático bruto de *Acremonium-like* ROG 2.1.9 foi estável em solvente imiscível em água, similar àquela produzida pelo fungo *P. aurantiogriseum* (LIMA et al., 2004). Os solventes orgânicos não polares geralmente são menos prejudiciais às enzimas, pois devido a sua hidrofobicidade, impedem a remoção da camada de água que recobre as enzimas e que é essencial para sua ativação (MANDER

et al., 2012; MASOMIAN et al., 2013) enquanto os solventes orgânicos polares, por serem hidrofílicos, interferem nessa camada de água ao redor da enzima e impede sua ação sobre o substrato (OGINO e ISHIKAWA, 2001).

Lipases estáveis em solventes orgânicos apresentam vantagens em reações de síntese que geram produtos de interesse industrial, tais como esterificação, transesterificação e interesterificação, uma vez que seus substratos e produtos são imiscíveis em água (HUN et al., 2003). Enzimas estáveis em solventes não polares, como o hexano, podem ser úteis na síntese de biodiesel por meio da reação de transesterificação, pois estes solventes melhoram a solubilidade dos triglicerídeos hidrofóbicos em alcoóis hidrofílicos e ainda protegem as enzimas da desnaturação quando há concentrações elevadas de álcool (GOG et al., 2012).

Tabela 5. Efeito de diferentes solventes orgânicos na estabilidade da atividade hidrolítica do extrato enzimático concentrado.

Solventes orgânicos	Log P^a	Atividade Residual (%)
Controle	-	100
<i>n</i> -hexano	3,6	92,8
Acetona	0,12	9,7
<i>n</i> -butílico	0,83	9,8
Metanol	-0,55	40,5
Iso-propanol	0,19	9
Etanol	-0,07	15,4
Terc butanol	0,66	3,7

^a Log P é a medida da hidrofobicidade. É o logaritmo da razão das concentrações do solvente em octanol e água.

4.1.6. Especificidade por substratos ésteres de *p*-Nitrofenol.

A lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9 apresentou maior atividade sobre os ésteres de *p*-nitrofenil de cadeias acima de 10 Carbonos como decanoato (C10:0), e *p*-nitrofenil laurato (C12:0) e *p*-nitrofenil palmitato (C16:0), apresentando atividade um pouco maior sobre o decanoato (Figura 10). Comportamento semelhante foi observado

com a lipase extracelular de *Geotrichum candidum* 4013, estudada por Brabcová, Zarevúcka e Macková (2010), que apresentou as maiores atividades quando foi utilizado ácidos graxos com cadeias médias (C:12) e longas (C:18). No entanto, a lipase purificada de *A. alcalophilus*, apresentou especificidade por p-nitrofenil caprilato (C:8), indicando diferenças significativas entre lipases produzidas por fungos do mesmo gênero.

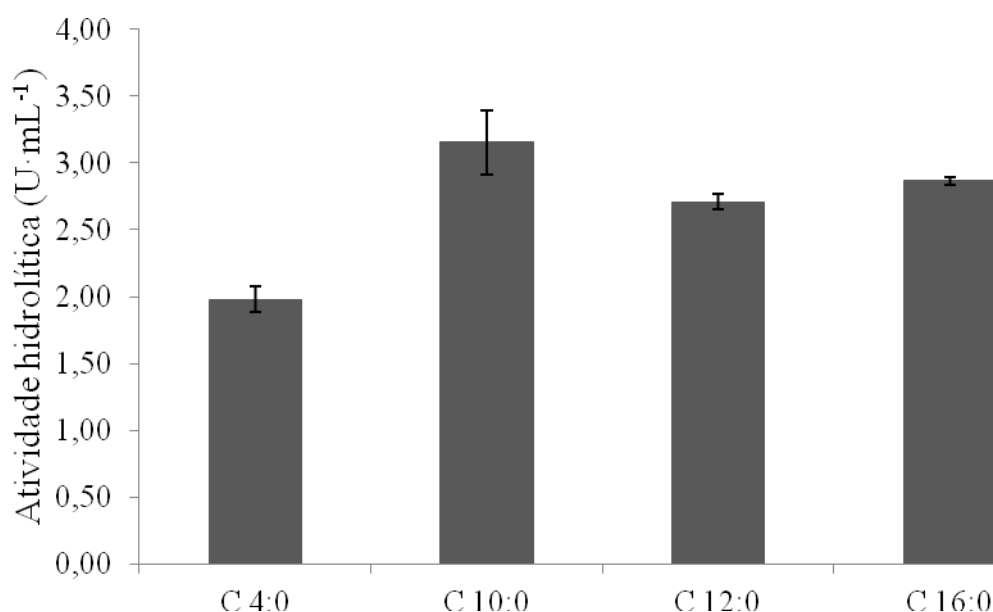


Figura 10. Especificidade da lipase por diferentes substratos ésteres de p-Nitrofenol: p-nitrofenil butirato (C4:0), p-nitrofenil palmitato (C16:0), p-nitrofenil decanoato (C10:0) e p-nitrofenil laurato (C12:0).

4.2. Imobilização da lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9

4.2.1-Purificação parcial da lipase para imobilização.

A precipitação de proteínas com sais aumenta a força iônica do sistema, portanto, quando uma baixa concentração de sal está presente em uma solução contendo proteínas carregadas positivamente e negativamente, os ânions e os cátions provenientes

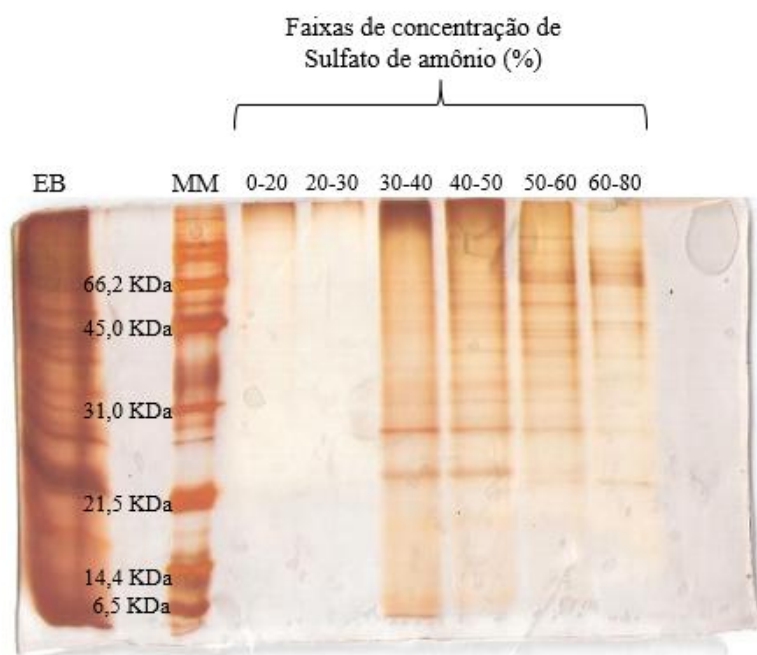
da dissociação do sal neutralizam as cargas presentes na superfície das proteínas, aumentando a solubilidade destas e prevenindo sua agregação. No entanto, com o aumento gradativo da concentração de sal a água passa a interagir com os íons provenientes da dissolução do sal, promovendo a desidratação das proteínas e sua consequente agregação e precipitação (Duong-Ly e Gabelli, 2014). O sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é o sal mais utilizado em precipitação de proteínas devido sua alta solubilidade, por gerar soluções de alta força iônica e por apresentar baixo custo.

Trabalhos prévios já haviam demonstrado a eficácia desse método na concentração de lipases de *Penicillium* sp. DS-39 (Dheeman et. al., 2011) e de *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 (Dheeman, Henahan e Frías, 2011).

Tabela 6. Tabela de Purificação da lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9 por precipitação fracionada com sulfato de amônio.

	Volume (mL)	Volume Total (mL)	Ativ. Enzimática Total (U)	Proteínas Total (mg)	Ativ. Específica U/mg	Rendimento (%)	Índice de Purificação
Solução enzimática bruta (C/ PMSF)	1500	1500	1350,0	60,0	22,5	100	1
Sol. Enzimática concentrada no QuixStand	300	300	1650,0	120,0	13,7	122	0,6
0-20%	20	20	9,6	0,3	34,3	1	1,5
20-30%	20	20	2,0	0,08	25,0	0	1,8
30-40%	19,5	19,5	50,7	2,1	23,6	528	0,7
40-50%	19	19	16,3	1,1	14,3	817	0,6
50-60%	18	18	3,6	0,7	5,0	7	0,2
60-80%	17,5	17,5	0,0	0,2	0,0	0	0,0

Figura 11. Gel SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Identificação das bandas: EB-extrato bruto, MM-marcador molecular



Esta etapa do trabalho buscou a obtenção de uma solução enzimática com menor quantidade de impurezas que pudessem interferir na imobilização dos diferentes suportes. A solução enzimática obtida do meio cultivo foi concentrada no QuixStand e posteriormente foi submetida à precipitação fracionada com sulfato de amônio, cujo teste preliminar mostrou que saturações entre 30 e 50% precipitou a maior quantidade da lipase (Tabela 6) com rendimentos entre 528 e 817% além de reduzir as proteínas contaminantes (Figura 11).

4.2.2- Imobilização da lipase em suportes hidrofóbicos, iônicos e por meio de ligação covalente.

Diferentes protocolos e suportes foram avaliados na imobilização da lipase e todos os procedimentos foram realizados em meio aquoso. Suportes hidrofóbicos foram utilizados com a intenção de aproveitar o mecanismo complexo das lipases que permite sua imobilização por interação hidrofóbica, uma vez que elas são capazes de reconhecer estas superfícies da mesma maneira que reconhecem seus substratos naturais (BASTIDA et al., 1998; PALOMO et al., 2002). A imobilização da lipase nos suportes

hidrofóbicos Sepabeads-C18, Lewatit 105 e Lewatit 1600 foi avaliada na ausência e na presença de triton x-100 (0,15% v/v).

Na ausência do surfactante no meio, a eficiência de imobilização nos três suportes foi menor quando comparada com a imobilização em solução contendo o triton x-100 (Tabela 7 e Figura 12). Isso pode ter ocorrido devido à tendência que algumas lipases têm de se agregarem e interagirem entre si por meio de suas regiões hidrofóbicas (sítio ativo), formando dímeros que impedem ou diminuem sua capacidade de interagir com estes suportes. A presença do detergente permite a dissociação dos dímeros de lipases e a estabilização de suas formas abertas aumentando a capacidade da enzima de interagir com a matriz hidrofóbica (MATEO et al., 2007).

Outra forma simples de imobilização reversível é por meio de interações iônicas em suportes carregados, como MANAE-agarose e PEI-agarose (MATEO et al. 2000; TORRES et al., 2006) sendo esta última avaliada neste trabalho. Porém, como um dos objetivos era buscar matrizes de baixo custo para a imobilização, além da agarose revestida com polietilenoimina (PEI-agarose) foram utilizados resíduos agroindustriais (sabugo de milho e bagaço de cana) carregados com grupamentos amina (MANAE-sabugo e MANAE-bagaço) e também sem nenhum tipo de tratamento.

Os resultados (Tabela 7) mostram que as imobilizações nos suportes PEI-agarose, MANAE-sabugo e MANAE-bagaço foram as mais eficientes com 100, 86,2 e 93% de lipase imobilizada, respectivamente, e além disso, a atividade da enzima imobilizada aumentou em cerca de 100%, com destaque para o derivado Lip-MANAE-bagaço. Na figura 12 observa-se ainda, que a máxima imobilização da lipase nestes suportes foi alcançada rapidamente, em aproximadamente 3 horas. A eficiência de imobilização por adsorção em bagaço de cana e sabugo de milho não tratados (38 e 31%) foi baixa e não houve atividade recuperada dos seus derivados indicando a necessidade do tratamento para tornar esses materiais matrizes de imobilização.

Tabela 7. Imobilização da lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9 em diferentes suportes.

Suportes		Proteína imobilizada (%)	Eficiência de imobilização (%)	Atividade recuperada (%)
Iônicos	PEI-agarose	64	100	142,3
	MANAE-Sabugo	80,3	86,2	199,6
	MANAE-Bagaço	95,5	93	141,7
	Bagaço não tratado	30	38	-
	Sabugo não tratado	28	31	-
Hidrofóbicos	Sepabeads C18	64	60	11
	Lewatit 1600	64,7	73	8,6
	Lewatit 105	74,5	54,2	36,6
	Lewatit 1600 (triton x-100)	62	78	16,5
	Lewatit 105 (triton x-100)	79,2	91	27,3
	Sepabeads C18 (triton x-100)	58	72	40,5
Ligação covalente	Glioxil-bagaço	11,7	81	-
	Glioxil-sabugo	16	89	-

Mendes et al. (2011) avaliaram algumas estratégias de imobilização da lipase G de *P. camemberti* e observaram que a enzima não se ligou a suportes hidrofóbicos, provavelmente devido a formação de dímeros que impedem a interação entre ambos, porém, a mesma lipase foi imobilizada em MANAE-agarose ativada e não ativada com glutaraldeído, com recuperação de atividades entre 8 e 14%. Em outro trabalho, Mendes et al. (2013) imobilizaram a lipase de *Termomyces lanuginosus* em diferentes suportes, dentre eles o bagaço de cana ativado com glicidol, epicloridrina e glutaraldeído, recuperando 75,5, 78,8 e 21,1%, respectivamente, da atividade inicial. Brígida et al. (2008) imobilizou a lipase B de *Candida antártica* em fibras de coco verde por adsorção com diferentes concentrações da enzima e a eficiência de imobilização variou entre 9 e 33%.

Deve ser ressaltado que cada enzima apresenta características intrínsecas, com diferentes enovelamentos, sequências de aminoácidos e de cargas de superfície e isso é um dos fatores que determinam a eficiência de sua imobilização em diferentes suportes iônicos.

A ativação observada para a enzima imobilizada em PEI-agarose, MANAE-sabugo e MANAE-bagaço pode ter ocorrido porque a força iônica estabelecida entre as superfícies das lipases e os suportes foi forte o bastante para evitar a interação entre as regiões hidrofóbicas (presente no sítio ativo) das enzimas levando a dissociação destas, evitando a formação dímeros e aumentando o acesso do substrato ao sítio ativo.

Com o intuito de se obter derivados com interações enzima-matriz mais estáveis, foi também realizados testes de imobilização por ligação covalente, obtendo-se para os suportes Glioxil-sabugo e Glioxil-bagaço 81 e 89% de imobilização da lipase, respectivamente, porém não foi detectada atividade enzimática no derivado. Resultado similar foi obtido por Mendes et al. (2011) ao imobilizarem a lipase G de *P. camemberti* em Glioxil-agarose também ativado com glicidol.

Uma das razões para a perda de atividade enzimática após imobilização pode ser decorrente da reação com boroidreto de sódio. A formação de bases fracas de Schiff (C=N) entre os grupos aldeídos e os resíduos de lisina presentes na superfície da enzima tornam-se ligações amino secundárias mais estáveis podendo resultar em uma redução na mobilidade da lipase, ou até mesmo provocar o deslocamento do sítio ativo, levando a inativação da enzima (MATEO et al., 2006).

4.4. Dessorção da lipase de suportes iônicos e hidrofóbicos.

A lipase imobilizada em PEI-agarose, MANAE-bagaço, bagaço de cana e sabugo de milho foi desorvida do suporte durante o tratamento com 1, 1,2, 0,4 e 0,8 M de NaCl, respectivamente, no entanto, não houve desorção do MANAE-sabugo até concentração máxima concentração do sal utilizada que foi de 1,2 M de sal (Tabela 8).

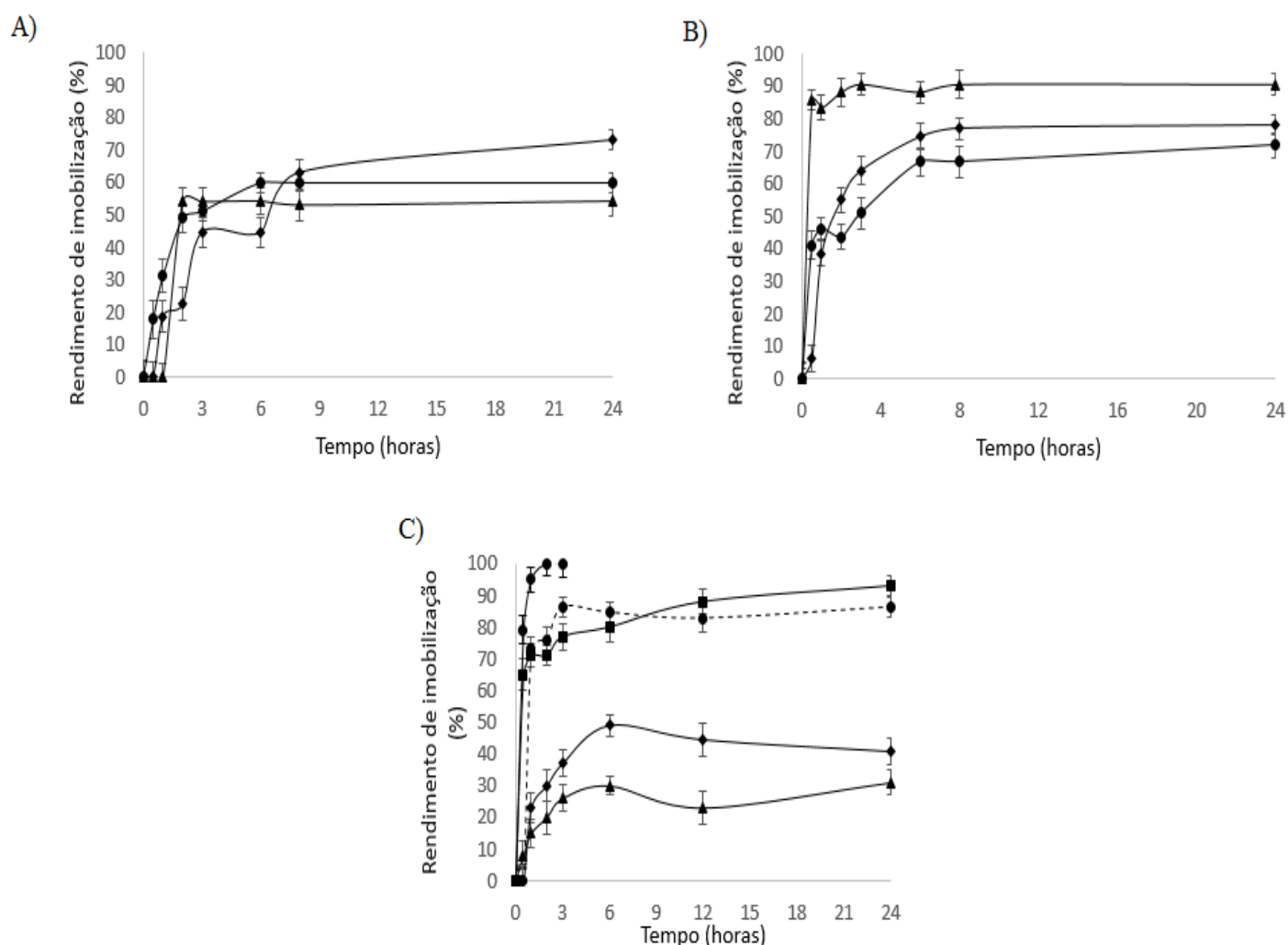


Figura 12. Progresso da imobilização de lipase nos diferentes suportes. (A) Suportes hidrofóbicos sem triton x-100 (B) Suportes hidrofóbicos com triton x-100 0,15% (v/v) —●— Sepabeads C18, —◆— Lewatit 1600, —▲— Lewatit 105 (C) Suportes iônicos. —●— PEI-Agarose, —■— MANAE-bagaço, —●— MANAE-sabugo, —◆— Bagaço de cana sem tratamento, —▲— Sabugo de milho

A lipase foi completamente liberada dos suportes hidrofóbicos após tratamento com triton (Lewatit 1600 com 0,3% de Triton x-100 e do Lewatit 105 com 0,8%) mas não foi desorvida do Sepabeads C18 mesmo usando a máxima quantidade de Triton x-100 (1,2%) (Tabela 8).

A força de adsorção depende tanto das características peculiares do suporte, quanto da enzima. Pereira et al. (2015) também avaliariam a dessorção da lipase de *Hypocrea pseudokoningii* de suportes hidrofóbicos e iônicos, e observou maior força de ligação nos suportes PEI-agarose e MANAE-agarose. Suportes revestidos com PEI (polietilenoimina) se ligam fortemente às enzimas em diferentes condições por apresentar maior densidade de grupos carregados, e ao ser comparado com outros suportes aminados (DEAE-agarose e MANAE-agarose) foram capazes não só de adsorver mais proteínas, como também as mesmas não foram dessorvidas tão facilmente desses suportes (MATEO et al., 2000).

Tabela 8. Dessorção da lipase dos diferentes suportes avaliados usando NaCl e Triton.

Suportes Iônicos	Lipase dessorvida (%)	Concentração de NaCl (M)
PEI-Agarose	100	1,2
MANAE-sabugo	0	1,2
MANAE-bagaço	100	1,2
Bagaço	100	0,4
Sabugo	100	0,8
Suportes hidrofóbicos		Concentração de Triton x-100 (%)
Sepabeads C18	0	1,2
Lewatite 1600	100	0,3
Lewatite 105	100	0,8

4.5. Avaliação da estabilidade dos derivados (enzimas imobilizadas) selecionados a 45°C e em etanol.

A estabilidade térmica da lipase solúvel e imobilizada em PEI-agarose, MANAE-sabugo e MANAE-bagaço foi comparada à 45°C. A figura 13 A mostra que o derivado Lip-MANAE-bagaço foi o mais estável, mantendo 45% de sua atividade após 24 horas, enquanto o derivado Lip-MANAE-sabugo e a enzima livre mantiveram 23% e 8% de atividade, respectivamente. O derivado PEI-agarose foi completamente inativado em 24 horas de incubação, mas em 6 horas ainda retinha 40% de sua atividade inicial (Figura 13 A).

Um dos objetivos da imobilização de enzimas é melhorar sua estabilidade térmica em relação a enzima solúvel, porém, isso pode depender da natureza do suporte e da temperatura utilizada, já que acima de determinada temperatura o suporte pode acelerar a inativação da enzima (CAO, 2005).

Os álcoois são considerados inibidores competitivos das lipases e isto se torna um problema quando o interesse é a aplicação destas enzimas na reação de transesterificação para produção de biodiesel, a qual, normalmente, é realizada com altas concentrações deste substrato; alcoóis de cadeia curta ainda podem inibir as lipases de forma irreversível e, portanto, é importante avaliar a capacidade dessas enzimas em suportar a presença desse solvente (ADLERCREUTZ, 2013). Normalmente o álcool utilizado na produção de biodiesel é o metanol, no entanto, considerando o número de trabalhos recentes que estudam a síntese deste biocombustível (FERRAREZI et al., 2014), este ensaio foi realizado com etanol, por ser um álcool obtido a partir de fontes renováveis.

Os derivados e a enzima livre foram incubados em 30% (v/v) de etanol para avaliar a estabilidade no solvente. A figura 13 B mostra que o derivado Lip-PEI-agarose foi o mais estável na presença do solvente, retendo 91% de sua atividade inicial após 24 horas, e os demais derivados apresentaram menor estabilidade em relação a enzima livre, com 68% (Lip-MANAE-sabugo) e 45% (Lip-MANAE-bagaço) de atividade remanescente. Pereira et al. (2015) também avaliaram a estabilidade em 50% de etanol da lipase de *Hypocrea pseudokoningii* imobilizada em diferentes suportes iônicos e observou que os derivados MANAE-agarose e PEI-agarose apresentaram meia vida de 17 e 24 horas, respectivamente.

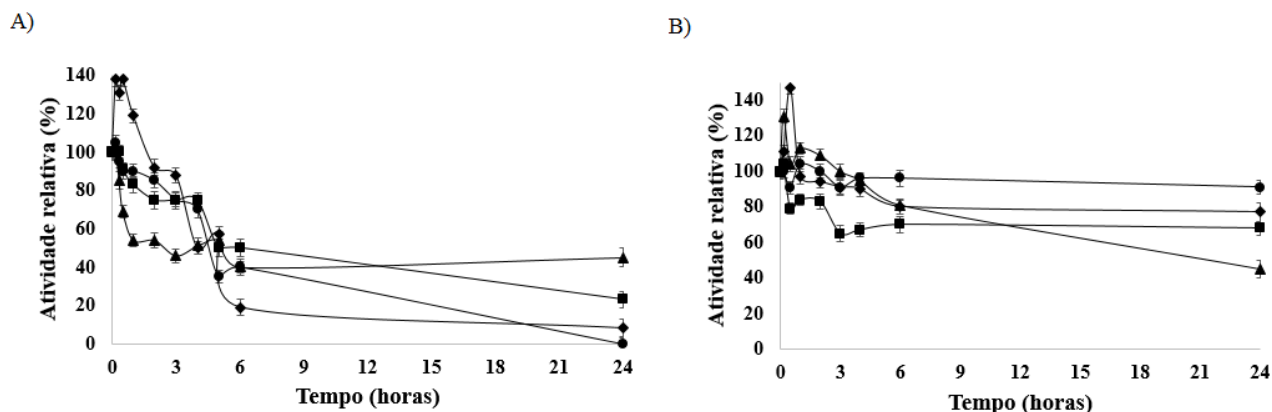


Figura 13. Avaliação da estabilidade térmica a 45°C (A) e estabilidade em etanol (30% v/v) (B).
 —◆— Enzima livre, —■— MANAE-sabugo, —▲— MANAE-bagaço, —●— PEI-Agarose

4.6. Efeito de solventes na atividade da lipase livre e imobilizada.

Nesta etapa foi avaliado o efeito de diferentes proporções de solventes (etanol, DMSO e n-hexano) na atividade da lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9 livre imobilizada nos suportes iônicos PEI-agarose, MANAE-sabugo e MANAE-bagaço (Figura 14). O derivado Lip-MANAE-sabugo apresentou ativação da atividade enzimática em cerca de 4,7 vezes com 10% de etanol, 2,5 vezes com 10% de DMSO e 3,5 vezes com 10% n-hexano, porém, acima dessas concentrações a atividade da enzima diminuiu.

A lipase imobilizada em MANAE-bagaço mostrou atividade 2,5 vezes e 3,5 vezes maior na presença de 10% de etanol e 10% de DMSO, respectivamente. A ativação da enzima livre ocorreu somente na presença de 10% de DMSO. O derivado Lip-PEI-agarose não foi ativado por nenhum dos solventes testados.

A produção de biodiesel com etanol, utilizando pelo menos dois derivados, é um dos objetivos futuros deste grupo de pesquisa, e assim, o efeito de baixas concentrações deste solvente foi positivo e deve ser estudado posteriormente na reação de transesterificação em meio orgânico.

A diferença de respostas dos complexos enzima-matriz aos efeitos dos solventes muitas vezes, depende da natureza do suporte utilizado (CAO, 2005) visto que estes podem interferir na conformação da enzima.

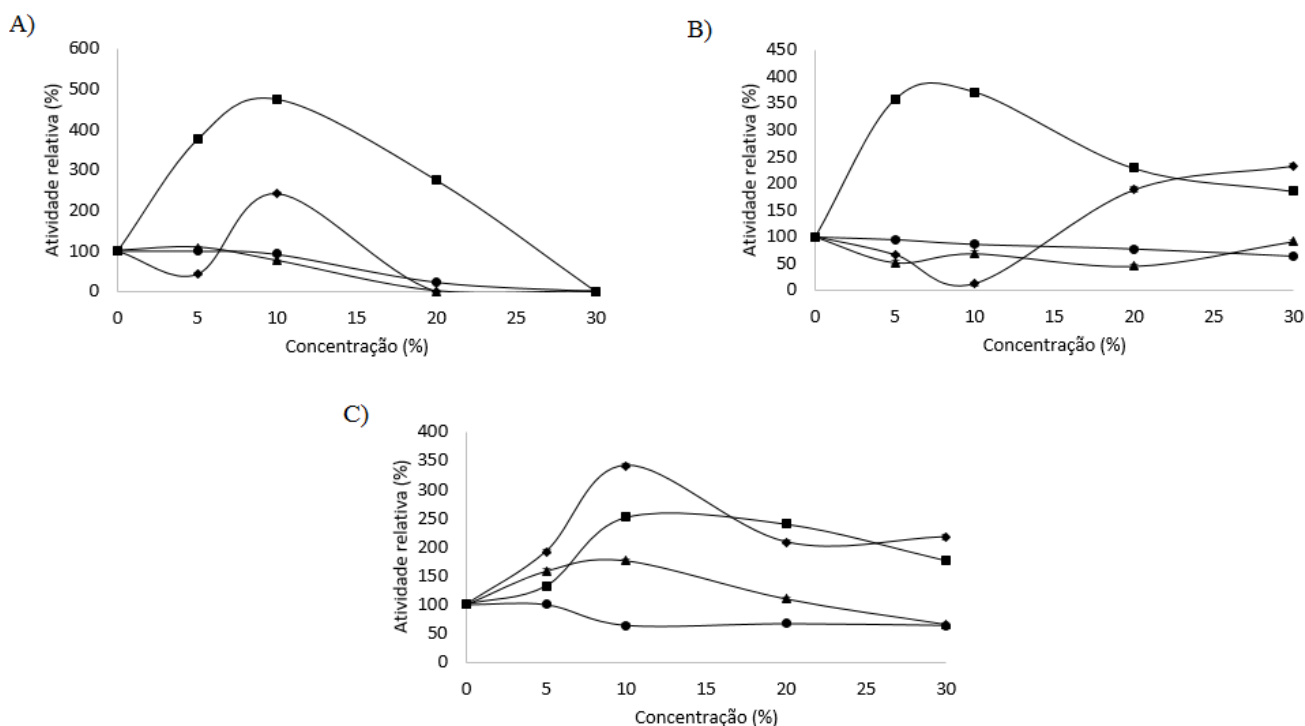


Figura 14. Efeito de solventes na atividade da —▲— lipase livre e immobilizadas em —●— PEI-agarose, —◆— MANAE-bagaço e —■— MANAE-sabugo (A) Etanol (B) n-Hexano (C) DMSO (Dimetil sulfóxido).

4.7. Efeito de surfactantes na atividade da lipase livre e imobilizada.

Em relação aos surfactantes, foram avaliadas diferentes concentrações de Triton x-100, CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) e SDS (Dodecil sulfato de sódio) na atividade da lipase livre e de seus respectivos derivados. Pode-se observar na figura 15 que o derivado Lip-MANAE-sabugo apresentou um perfil semelhante de ativação para os dois surfactantes com aumento de 1,7 e 1,6 vezes na sua atividade. A atividade do derivado Lip-MANAE-bagaço aumentou cerca de 1,6 vezes com 0,1% de Triton x-100 e 2 vezes com 0,3% de CTAB. Ainda na mesma figura 15 observa-se que o derivado Lip-PEI-agarose teve sua atividade aumentada mais de 2 vezes com 0,1% de Triton x-100 e manteve-se até 0,5%, contudo, sua atividade foi inibida na presença de CTAB e SDS, que foi adicionada até uma concentração de 0,5%. A enzima livre e imobilizada em MANAE-sabugo e MANAE-bagaço foram imediatamente inativadas na presença de SDS no meio de reação.

O triton x -100 é um detergente não iônico e interage com a região hidrofóbica da lipase, ou seja, seu sítio ativo, aumentando sua capacidade catalítica, como observado em alguns trabalhos (Yeşiloğlu e Başkurt, 2008). Os surfactantes iônicos SDS (aniônico) e CTAB (catiônico), podem promover interações hidrofóbicas e iônicas com as lipases ou com as lipases e seu suporte, causando hiperativação ou inativação de sua atividade. De acordo com os resultados apresentados, o CTAB foi capaz de aumentar a atividade da enzima livre e dos derivados Lip-MANAE-sabugo e Lip-MANAE-bagaço, e o SDS foi inibidor para lipase solúvel e todos os derivados, sem inativar completamente a atividade do derivado Lip-PEI-agarose.

Salameh e Wiesel (2010) mostraram que o SDS aumentou a atividade da lipase livre de *Thermosyntropha lipolytica* a baixas concentrações, e atribuiu tal resultado a mudanças conformacionais na enzima causadas pela ligação das micelas de SDS ao lid que encobre o sítio ativo da enzima. Quilles et al. (2014) também avaliaram o efeito destes mesmos surfactantes na atividade dos derivados Lecitase-PEI, CAL B-Octil e TLL-PEI e observou que o triton x-100 e o CTAB aumentou e inibiu, respectivamente, somente a atividade de CAL B-Octil, e que o SDS hiperativou Lecitase-PEI.

Todos os resultados sugerem que o efeito dos diferentes surfactantes envolve interações hidrofóbicas e eletrostáticas e pode ser distinto para a mesma enzima imobilizada em diferentes suportes, uma vez que o modo como ela está ligada a matriz pode ser relevante na sua interação com determinados detergentes.

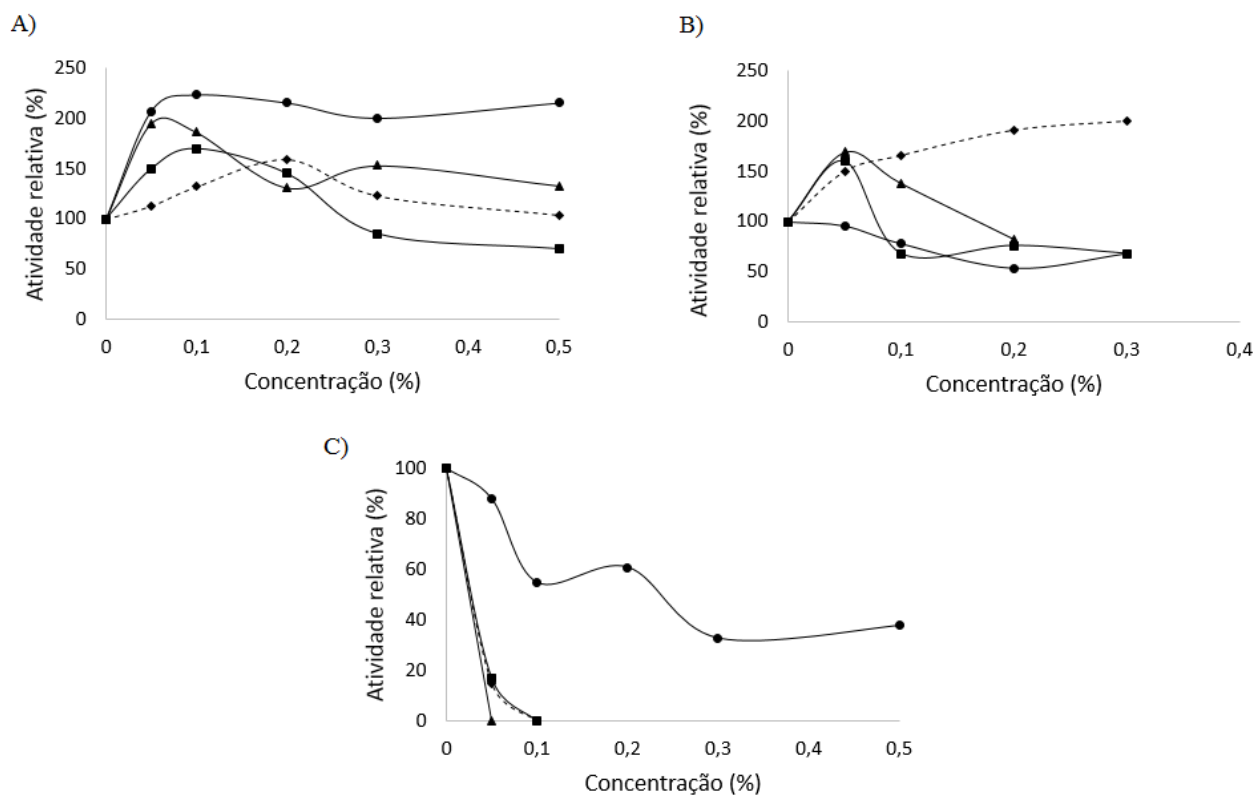


Figura 15. Efeitos de surfactantes na atividade da lipase (A) Triton x-100 (B) CTAB (C) SDS. —●— PEI-agarose, —■— MANAE-sabugo, ---◆--- MANAE-sabugo, —▲— Enzima livre

5-CONCLUSÕES

A lipase de *Acremonium*-like ROG 2.1.9 apresentou características bioquímicas (pH e temperaturas ótimas) similares a outras produzidas por fungos filamentosos, com boa estabilidade em etanol e n-hexano o que lhe confere potencial para ser usada na biossíntese de biodiesel.

A enzima imobilizada em suportes iônicos gerou complexos mais estáveis. Os suportes a base de resíduos agro-industriais (MANAE-bagaço e MANAE-sabugo), que foram um importante enfoque do trabalho, constituíram bons suportes de imobilização levando a uma nova proposta de aproveitamento dessa biomassa além de serem suportes de baixo custo. Esses derivados (Lip-PEI-agarose, Lip-MANAE-bagaço e Lip-MANAE-sabugo) ainda preservaram e/ou estimularam a atividade da enzima frente à temperatura de 45°C e em presença de solventes orgânicos associados aos processos de biossíntese de biodiesel ou na determinação da atividade de lipases.

REFERÊNCIAS

ABIGOR, R. D.; UADIA, P. O.; FOGLIA, T. A.; HAAS, M. J.; SCOTT, K.; SAVARY, B. J. Partial Purification and Properties of Lipase from Germinating Seeds of *Jatropha curcas* L. **Journal American Oriental Society**. v. 79, n. 11, p. 1123-1126, 2002.

ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**. v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase immobilization: an equilibrium study of lipases immobilized on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. **Biochemical Engineering Journal**. v. 4, p. 207-215, 2000.

ASHJARI, M.; MOHAMMADI, M.; BADRI, R. Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 115, p. 128-134, 2015.

BASTIDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J. M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 58, p. 486-493, 1998.

BETANCOR, L.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 877-882, 2006.

BEZBRADICA, D.; KARALAZIC, I.; OGNJANOVIC, N.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. Studies on the specificity of *Candida rugosa* lipase catalyzed esterification reactions in organic media. **Journal Serbia Chemistry Society**. v. 71, n. 1, p. 31-41, 2006.

BORNSCHEUER, U. T. Microbial carboxyl esterases : classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p. 73-81, 2002.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R. KRISHNA, S. H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BRABCOVÁ, J.; ZAREVÚCKA, M.; MACKOVÁ, M. Differences in hydrolytic abilities of two crude lipases from *Geotrichum candidum* 4013. **Yeast.**, v. 27, n. 12, p. 1029-1038, 2010.

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

BRÍGIDA, A. I. S.; PINHEIRO, A. D. T.; FERREIRA, A. L. O.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antartica* Lipase B by adsorption to Green Coconut Fiber. **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, v. 146, p. 173-187, 2008.

BRITO, R. Isolamento de fungos produtores de lipases catalisadoras das reações de transesterificação para a produção de Biodiesel. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**. São José do Rio Preto/SP. 2012.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J. G. Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75-80, 2003.

CASTRO, H. F.; LIMA, R.; ROBERTO, I. C. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. **Biotechnology Progress.** v. 17, p. 1061-1064, 2001.

CHENG, M.; ANGKAWIDJAJA, C.; KOGA, Y.; KANAYA, S. Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures. **The FEBS Journal.** v. 279, p. 3727-3737, 2012.

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

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

DHEEMAN, D. S.; HENEHAN, G. T. M.; FRÍAS, J. M. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. **Bioresource Technology.** v. 102, p. 3373-3379, 2011.

DOBREV, G.; ZHEKOVA, B.; NEDELICHEVA, P.; CHOCHKOV, R.; KRASTANOV, A. Characterization of crude lipase from *Rhizopus arrhizus* and purification of multiplicity forms of the enzyme. **Education and Basic Science.** v. 25, p. 2295-2300, 2011.

DUONG-LY, K. D.; GABELLI, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods in Enzymology.** v. 541, p. 85-94, 2014.

EASTMOND, P. J. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 279, n. 44, p. 45540-45545, 2004.

ERICSSON, D. J.; KASRAYAN, A.; JOHANSSON, P.; BERGFORS, T.; SANDSTROM, A. G.; BACKVALL, J. E.; MOWBRAY, L. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology,** v. 376, p. 109-119, 2008.

FERNANDEZ-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.

FERRAREZI, A. L.; OHE, T. H. K.; BORGES, J. P.; BRITO, R. R.; SIQUEIRA, M. R.; VENDRAMINI, P. H.; QUILLES, J. C.; NUNES, C. C. C.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; BOSCOLO, M.; DA-SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of lipases and immobilization of whole cell of the thermophilic *Thermomucor indicae seudaticae* N31 for transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** v.107, p. 106-113, 2014.

FILHO, M.; PESSELA, B. C.; MATEO, C.; CARRASCOSA, A. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Reversible immobilization of a hexameric α -galactosidase from *Thermus* sp. strain T2 on polymeric ionic exchangers. **Process Biochemistry**. v. 43, p. 1142-1146, 2008.

DA SILVA FILHO, R. R. S.; TORRALBO, D. F.; DI-MEDEIROS, M. C. B.; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F. Immobilization of lipase in pectin extracted from lobeira fruit (*Solanum lycocarpum* St. Hil.). **Biochemistry and Biotechnology Reports**. v. 1, n. 1, p. 9-14, 2012.

FUENTES, M.; PESSELA, B. C.; MAQUIESE, J. V.; ORTIZ, C.; SEGURA, R. L.; PALOMO, J. M.; ABIAN, O.; TORRES, R.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M. Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran. **Biotechnology Progress**. v. 20, n. 4, p. 1134-1139, 2004.

GELLERSTEDT, F.; GATENHOLM, P. Surface properties of lignocellulosic fibers bearing carboxylic groups. **Cellulose**, v. 6, n. 2, p. 103-121, 1999.

GIRELLI, A. M.; MATTEI, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Chromatography B**. v. 819, p. 3-16, 2005.

GITLESEN, T.; BAUER, M.; ADLERCREUTZ, P. Adsorption of lipase on polypropylene poder. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1345, p. 188-196, 1997.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOŞA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives production from soybean oil. **Renewable Energy**, v. 39, p. 10-16, 2012.

GREEN. A. A.; HUGHES. W. L. Protein Fractionation on the Basis of Solubility in Aqueous Solutions of Salts and Organic Solvents. **Protein Fractionation by Solubility**. v. 1, p. 67-90, 1955.

GUIDINI, C. Z.; FISCHER, J.; SANTANA, L. N. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -Galactosidase in ion exchange resins by

combined ionic-binding method and cross-linking. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, p. 137-143, 2010.

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

GUISÁN, J. M.; PENZOL, G.; ARMISEN, P.; BASTIDA, A.; BLANCO, R. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-JUNCEDA, E. Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates: Reduction of steric problems. **Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 1, p. 261-275, 1997.

HABIBI, Z.; MOHAMMADI, M.; YOUSEFI, M. Enzymatic hydrolysis of racemic ibuprofen esters using *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on different supports. **Process Biochemistry**. v. 48, n. 4, p. 669-676, 2013

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

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Encyclopedia of Microbiology**. e. 3, p. 385-392. 2009.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 118, p. 155-170, 2004.

HUN, C. J., RAHMAN, R. N. Z. A., SALLEH, A. B., BASRI, M. A. Newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 15, p. 147-151, 2003.

ITTRAT, P.; CHACHO, T.; PHOLPRAYOON, J.; SUTTIWARAYANONA, N.; CHAROENPANICHA, J. Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 3, p. 77-82, 2014.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase- A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 28, p. 253-264, 2008.

KRIEGER, N. Produção, purificação e caracterização de lipases de *Penicillium citrinum*. 1995. 260 f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, **Universidade Federal do Paraná**. Curitiba. 1995.

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 organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v.18, n.1, p.65-71, 2004.

MANDER, P.; CHO, S. A.; SIMKHADA, J. R.; CHOI, Y. H.; PARK, D. J.; HÁ, J. W.; YOO, J. C. An organic solvent-tolerant alkaline lipase from *Streptomyces* sp. CS268 and its application in biodiesel production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 67-75, 2012.

MASOMIAN, M.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 169-175, 2013.

MATEO, C.; ABIAN, O.; FERNADÉZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsoption on support Polyethylenimine composites. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 68, p. 98-105, 2000.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; BETANCOR, L.; GRAZU, V.; LÓPEZ-GALLEGU, F.; PESSELA, B. C. C.; HIDALGO, A.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 274-280, 2006.

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.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S.; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 71, p. 53-57, 2015.

MATTE, C. R.; BUSSAMARA, R.; DUPONT, J.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase by Different Techniques on Immobead 150 Support: Characterization and Applications. **Application Biochemistry Biotechnology**. v. 172, p. 2507-2520, 2014.

MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. F. C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipases de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**. v. 36, n. 2, p. 245-251, 2013.

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**. p. 1-8, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; CASTRO, H. F. Evaluation of immobilized lipases on polyhydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 50, n. 3, p. 503-511, 2012.

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, 2011.

MENDES, A. A. Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel. 2009. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). **Universidade Federal de São Carlos**. São Carlos. 2009.

OGINO, H.; ISHIKAWA, H. Enzymes which are stables in the presence of organics solvents. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, n. 2, p. 109-116, 2001.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 19-20, p. 279-286, 2002.

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

PARK, S.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; YU, H.; KIM, H. J.; YANG, Y. H.; KIM, H.; KIM, Y. H.; HA, S. H.; LEE, S. H. Application of cellulose/lignin hydrogel beads as novel supports for immobilizing lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 119, p. 33-39, 2015.

PEREIRA, E. O.; TSANG, A.; MCALLISTER, T. A.; MENASSA, R. The production and characterization of a new active lipase from *Acremonium alcalophilum* using a plant bioreactor. **Biothecnology for Biofuels**. v. 6, p. 1-10. 2013.

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.; GUISAN, 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.

PETKAR, M.; LALI, A.; CAIMI, P.; DAMINATI, M. Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 39, p. 83-90, 2006.

PIZARRO, C.; BRAÑES, M. C.; MARKOVITS, A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; CHAMY, M.; 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. 11-118, 2012.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; PEIKER, M.; THIELE, C.; SCHMID, R. D. Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence–structure–function relationships. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, p. 491-508, 2000.

PRADELLA, J. G. C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, cap. 16, p. 355-372, 2014.

QUILLES, J. C. J.; BRITO, R. R.; BORGES, J. P. ARAGON, C. C.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; GOMES, E.; BOSCOLO, M.; GUIBAN, J. M. Modulation of the activity and selectivity of the immobilized lipases by surfactants and solvents. **Biochemical Engineering Journal**. v. 93, p. 274-280, 2015.

RAMOS, E. Z.; MIOTTI JUNIOR, R. H.; CASTRO, P. F. TARDIOLI, P. W.; MENDES, A. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 118, p. 43-51, 2015

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.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V. POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **LW T - Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; REMONATO, D.; SYCHOSKI, M.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M. Preliminary characterization of novel extra-cellular lipase from *Penicillium crustosum* under solid-state fermentation and its potential application for triglycerides hydrolysis. **Food Bioprocess Technology**., v. 5, p. 1592-1600, 2012.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolisys: A simple and eficiente way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an

immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**. v. 45, p. 1268-1273, 2010.

RUEDA, N.; SANTOS, J. C. S.; ORTIZ, C.; BARBOSA, O.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**. v. , p. 1-12, 2015.

SALAMEH, M. A.; WIEGEL, J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **The Open Biochemistry Journal**. v. 4, p. 22-28, 2010.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; TARABIONO, C.; GATTI-LAFRANCONI, P.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; JAEGER, K. E.; PULS, M.; EGGERT, T. The lid is a structural and functional determinant of lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic activity and selectivity**. v. 39, p. 166-170. 2006.

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

SHELDON, R. A; PELT, S. V. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.

SOUZA, S. F.; GODBOLE, S. S. Immobilization of invertase on Rice husk using polyethylenimine. **Journal Biochemistry Biophysic. Methods.**, v. 52, p. 59-62, 2002.

SRIMHAN, P.; KONGNUM, K.; TAWEERODJANAKARN, S.; HONGPATTARAKERE, T. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 293-298, 2011.

SILVA, J. A.; MACEDO, G. P.; RODRIGUES, D. S.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R. B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalente attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**. v. 60, p. 16-24, 2012.

TORRES, R.; ORTIZ, C.; PESSELA, C. C. B.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida Antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 39, p. 167-171, 2006.

VAYSSE, L.; LY, A.; MOULIN, G.; DUBREUCQ, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 648-655, 2002.

WALT, D. R.; AGAYN, V. I. The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 13, n. 10, p. 425-430, 1994.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of the functional properties of a thermostable lipase from *Alcaligenes* sp. via strong adsorption on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, n. 7, p. 975-980, 2006.

ZHANG, D. H.; PENG, L. J.; WANG, Y.; LI, Y. Q.; Lipase immobilization on epoxy-activated poly(vinyl acetate-acrylamide) microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 129, p. 206-210, 2015.

ZHIJIANG, C.; YI, X.; HAIZHENG, Y.; JIA, J.; LIU, Y. Poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate blend nanofiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility. **Materials Science and Engineering: C**. v. 58, p. 757-767, 2016.

YAN, J.; LIU, S.; HU, J.; GUI, X.; WANG, G.; YAN, Y. Enzymatic enrichment of polyunsaturated fatty acids using novel lipase preparations modified by combination of immobilization and fish oil treatment. **Bioresource Technology**. v. 102, n. 14, p. 7154-7158, 2011.

YUCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3977-3980, 2011.

YEŞİLOĞLU, Y.; BAŞKURT, L. Partial purification and characterization of almond seed lipase. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. v. 38, n. 4, p. 397-410, 2008.