



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

BÁRBARA MARTINELI BONINE

PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO
Myceliophthora sp. F 2.1.4, CARACTERIZAÇÃO
E IMOBILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO
ENZIMÁTICA BRUTA

São José do Rio Preto/SP
março, 2011

BÁRBARA MARTINELI BONINE

PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO
Myceliophthora sp. F 2.1.4, CARACTERIZAÇÃO
E IMOBILIZAÇÃO DA SOLUÇÃO
ENZIMÁTICA BRUTA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Eleni Gomes

Co-Orientador: Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez

São José do Rio Preto/SP
Março, 2011

BÁRBARA MARTINELI BONINE

PRODUÇÃO DE LIPASE PELO FUNGO *Myceliophthora* sp. F

2.1.4, CARACTERIZAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DA
SOLUÇÃO ENZIMÁTICA BRUTA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, área de Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Eleni Gomes
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Maurício Boscolo
Professor Assistente Doutor
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Humberto Márcio Santos
Milagre
Professor Doutor
UNESP – Rio Claro

São José do Rio Preto, 28 de março de 2011

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me confortar nos momentos difíceis e iluminar o meu caminho

À Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes por acreditar no meu potencial, me ensinar e me encorajar nas difíceis escolhas

Ao Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez pela co-orientação e pelos primeiros ensinamentos relacionados à pesquisa.

À Dr^a. Ana Lúcia Ferrarezi por iniciar os estudos com a lipase no laboratório, pelas dicas, pelo companheirismo e pela amizade. Ao grupo Biodiesel, Ana, Jana, Thiago e Rafa, pelas experiências divididas e pela garra de sempre.

Aos amigos queridos do laboratório que fizeram com que os dias difíceis se tornassem mais agradáveis, os dias fáceis se tornassem divertidos e que fizeram dos almoços momentos inesquecíveis: Ana Lúcia, André, Andréa, Aline, Ariane Zancheta, Ariane (IC), Bárbara Garcia, Babi, Carol B., Carol M., Cristiane, Daniela, Fernanda, Ellen, Fabi, Gisele, Josiane, Isabel, Larissa, Márcia, Milla, Tássia, Thiago Okubo, Rafa, Ricardo e Ruan.

Às amigas do laboratório de Bioquímica de proteínas, onde iniciei meu trabalho científico e fiz grandes amizades: Ana, Paty, Rejane, Débora, Lilian, Letícia, Laís, Angélica.

À Minha família pelo apoio e confiança: Pai, Mãe e Ninha, amo vocês.

Ao meu noivo pela amizade, paciência, amor, carinho, incentivo e apoio.

Às minhas amigas que acompanham a minha caminhada, de longe ou de perto: Mary, Paola, Camila, Bru, Lilian, Joice, Lívia.

À CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo incentivo à pesquisa.

“Agradeço por todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”. Chico Xavier

Sumário

Resumo	ix
Abstract	x
Introdução	1
Capítulo 1: Revisão Bibliográfica	2
1. Enzimas	2
1.1 Lipases	2
1.2 Fontes para obtenção das lipases	7
1.3 Reações catalisadas pelas lipases	8
1.4 Aplicações industriais das lipases	10
2. Imobilização de enzimas e células	14
3. Fermentação em estado sólido e submersa	19
Objetivos	22
Referência Bibliográfica	23
Capítulo 2: Produção de lipase por processos fermentativos em estado sólido, submerso e semi-sólido utilizando o fungo <i>Myceliophthora</i> sp F 2.1.4	32
1. Introdução	33
2. Material e métodos	34
3. Resultados e discussão	38
4. Conclusões	49
5. Referências bibliográficas	50
Capítulo 3: Caracterização parcial e imobilização da lipase produzida pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp F 2.1.4	53

1. Introdução	54
2. Material e métodos	55
3. Resultados e discussão	60
4. Conclusões	71
5. Referências bibliográficas	72

Lista de Figuras

Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

Figura 1: Modelo estrutural do sítio ativo de α/β hidrolases	3
Figura 2: Mecanismo da hidrólise pelas lipases	4
Figura 3: Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,4 específica	7
Figura 4: Reações catalisadas por lipases	9
Figura 5: Reação de transesterificação catalisada pelas lipases	10
Figura 6: Métodos de imobilização de enzimas	16
Figura 7: Representação da estrutura do alginato. (A) blocos homopoliméricos de resíduos M; (B) blocos homopoliméricos de resíduos G; (C) blocos heteropoliméricos de resíduos M e G	17
Figura 8: Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas por meio dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas por meio dos íons cálcio	18
Figura 9: Estrutura da quitosana	18

Capítulo 2: Produção de lipase por processos fermentativos em estado sólido, submerso e semi-sólido utilizando o fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4

Figura 1:	Efeito das fontes de carbono suplementares na produção de lipase em FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp. F 2.1.4 em meio contendo bagaço de cana de açúcar como suporte e óleo de oliva como indutor, a 45°C, por 72 horas.....	39
Figura 2:	Efeito de fontes de nitrogênio na produção de lipase em FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp. F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas, utilizando sacarose como fonte de carbono suplementar.....	41
Figura 3:	Efeitos da concentração de sacarose na produção de lipase em FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas.....	41
Figura 4:	Efeitos da concentração de nitrato de amônio na produção de lipase em FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas.....	42
Figura 5:	Efeitos da relação Carbono e nitrogênio (C:N) na produção de lipase em FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas.....	43
Figura 6:	Efeito de diferentes óleos como indutores de lipase na FES pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp. no. F 2.1.4., a 45°C, por 72 horas.....	44
Figura 7:	Efeito da quantidade de esporos usados no inóculo na FES para a produção de lipase pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp. 1) 5×10^5 esporos; 2) 5×10^6 esporos e 3) 5×10^7 esporos.....	45
Figura 8:	Extração da lipase a partir do material sólido fermentado pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp utilizando diferentes eluentes.....	46
Figura 9:	Efeito do tempo de cultivo na produção de lipase pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp em FES, utilizando o meio composto por bagaço de cana de açúcar, sacarose, nitrato de amônio e óleo de oliva, a 45°C e extraíndo-se a enzima com 50 ml de solução de triton X-100 (1%).....	47
Figura 10:	Produção de lipase e biomassa pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp n ^o F 2.1.4 em FSm, a 45°C e 100 rpm.	48

Capítulo 3: Caracterização parcial e imobilização da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4

Figura 1:	Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade da lipase produzida pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp. utilizando-se os métodos titulométrico (A) e colorimétrico (B).....	60
-----------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Figura 2:	Efeito do Estabilidade térmica da lipase produzida pelo fungo <i>Myceliophthora</i> sp.....	61
Figura 3:	Efeito da variação do pH do meio sobre a atividade da lipase produzida por <i>Myceliophthora</i> sp.....	63
Figura 4:	Número de ciclos obtidos com a reutilização da lipase imobilizada em alginato de cálcio	68
Figura 5:	Estabilidade térmica da lipase imobilizada em esferas de alginato de cálcio.....	69
Figura 6:	Número de ciclos obtidos com a reutilização da lipase imobilizada em quitosana.....	70
Figura 7:	Estabilidade térmica da lipase imobilizada em quitosana	71

Lista de tabelas

Capítulo 2: Produção de lipase por processos fermentativos em estado sólido, submerso e semi-sólido utilizando o fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4

Tabela 1:	Porcentagem dos ácidos oléico, linoléico e linolênico nos óleos vegetais de diferentes origens.....	44
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 3: Caracterização parcial e imobilização da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4

Tabela 1:	Comportamento da lipase frente a diferentes compostos	63
Tabela 2:	Atividade da lipase quando exposta a diferentes íons	64
Tabela 3:	Comportamento da lipase em diferentes solventes orgânicos	65
Tabela 4:	Atividade da lipase sobre diferentes tipos de óleos	66
Tabela 5:	Especificidade da lipase para substratos sintéticos	66
Tabela 6:	Retenção da lipase com relação às diferentes concentrações de alginato e de cloreto de cálcio testadas.	67

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4, por fermentação em estado sólido (FES), fermentação submersa (FS) e fermentação semi-sólida. Alguns testes foram realizados para a obtenção do meio nutricional que melhor proporciona a produção da lipase. Nas condições encontradas foi possível a obtenção de 21 U/mL de lipase na FES, enquanto que para a FS, a produção caiu bruscamente tendo conseguido somente 0,20 U/mL, indicando que a FES foi mais adequada para a produção de lipase por *Myceliophthora* sp F 2.1.4. As mesmas condições também foram testadas para a fermentação semi-sólida com o uso de buchas vegetais e, dessa forma, a produção enzimática voltou a aumentar com aproximadamente 9 U/mL. A caracterização parcial da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp. F 2.1.4 por fermentação em estado sólido indicou que a enzima atua em seu máximo em pH entre 5,0 e 7,0 e a temperatura de 35°C sendo estável entre 35 e 50°C e em faixa de pH 4,0 e 9,0. A enzima foi sensível a SDS, Al³⁺ e Hg²⁺ e tolerante a etanol e metanol, solventes utilizados na produção de biodiesel. Quanto à especificidade aos substratos, a lipase apresentou atividade crescente com o aumento da cadeia acila dos substratos sintéticos, conseguindo atuar em substratos com cadeia superior a 10 carbonos, critério utilizado para classificar uma enzima como lipase. Além disso, ela atuou bem em todos os substratos naturais testados, mostrando sua eficiência para aplicações de digestão de óleos. A lipase foi imobilizada em alginato de cálcio e em quitosana sendo possível uma reutilização da enzima por 6 e 12 vezes consecutivas, respectivamente. Estes resultados mostram que as propriedades físico-químicas da lipase de *Myceliophthora* sp F 2.1.4 possuem um grande potencial para aplicações industriais.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the production of lipase by the fungi *Myceliophthora* sp F 2.1.4, by solid-state fermentation (SSF), submerged fermentation (SmF) and semisolid fermentation. Several tests were made in order to obtain the best nutritional media to lipase production. These conditions were tested for SSF, SmF and semisolid fermentation. The results of the tests showed that for SSF it was possible to obtain 21 U/mL of lipase. On the other hand, for SmF, the production declined brusquely having obtained only 0,20 U/mL, indicating that the SSF was more appropriate for the production of lipase by *Myceliophthora* sp F 2.1.4 than SmF. In addition, for semisolid fermentation, using loofa sponges, the enzymatic production increased again with approximately 9 U/mL. Partial characterization of lipase produced SSF showed that this enzyme has maximum activity in both pH between 5,0 and 7,0 and temperature of 35 °C, being stable between 35 and 50 °C and in range of pH 4,0 and 9,0. The enzyme was sensible to SDS, Al³⁺ and Hg²⁺, and tolerant to ethanol and methanol, solvent used for biodiesel production. Regarding the substrate specificity, the tests proved that the enzyme studied seems to be a real lipase since it could act in long-chain substrate. Moreover, it acted effectively for all natural substrates tested, being efficient for applications of oil digestion. Lipase was immobilized in alginate of calcium and chitosan, with the possibility of reuse of 6 and 12 consecutive times, respectively. These results imply that the physicochemical properties of lipase produced by *Myceliophthora* sp F 2.1.4 make it a great potential for industrial applications.

INTRODUÇÃO

A aplicação de enzimas em processos biotecnológicos apresenta vantagens significativas sobre as reações químicas tradicionais. Dentre os processos biotecnológicos de transformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em reações de hidrólise e de síntese, podendo catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, com teor de água restrito. Além disso, possuem capacidade de atuação em uma ampla gama de substratos e apresentam quimio-regio e enantiosseletividade. Entre as lipases de vegetais, animais e microbianas, estas últimas são as mais utilizadas, pela facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las.

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos, de detergentes, agroquímica, oleoquímica e biocombustíveis. Apesar das vantagens evidentes do uso de lipases nesses processos, existem ainda problemas a serem resolvidos, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção e purificação muitas vezes torna os processos enzimáticos inviáveis.

Este trabalho trata da produção de lipase pelo fungo termofílico *Myceliophthora* sp F 2.1.4 e a caracterização parcial da enzima e sua imobilização por encapsulação e ligação covalente, buscando contribuir para o desenvolvimento da tecnologia enzimática brasileira.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enzimas

Enzimas são proteínas biocatalíticas que regulam a velocidade das reações bioquímicas que ocorrem nos sistemas vivos. Atuam de forma a acelerar a reação com redução de energia de ativação, sem, no entanto, alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre da reação. O que as diferencia de um catalisador sintético (químico) é a sua capacidade de catalisar uma reação em condições brandas, como em soluções aquosas em temperaturas baixas e pressão normais, com conseqüente diminuição do risco de desnaturação térmica dos compostos termolábeis, da redução das necessidades energéticas e dos efeitos corrosivos dos processos (KENNEDY; CABRAL, 1983; DIXON; WEBB, 1986; BAILEY; OLLIS, 1986). Algumas enzimas também podem exercer sua atividade catalítica em meios orgânicos, e em condições de alta pressão, como é o caso das lipases, álcool desidrogenases e fosfatase alcalina (DORDICK, 1991).

1.1 Lipase

As lipases são enzimas encontradas em microrganismos, plantas e animais (GILBERT, 1993; WOHLFAHRT, 1993; JAEGER et al. 1994). Elas são classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus substratos preferidos (JAEGER; REETZ, 1998). As lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas de ambiente até 70°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (JAEGER et al., 1994; VULFSON, 1994; WOOLLEY; PETERSEN, 1994; PEREIRA, 1995; SVENDSEN et al., 1997; SHANLEY, 1998; JAEGER; REETZ, 1998; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

A estrutura terciária de todas as lipases descritas, tanto de eucariotos quanto procariotos, é do tipo α/β hidrolase (SCHRAG; CYGLER, 1997). O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. O resíduo nucleofílico serina está localizado no C-

terminal da fita $\beta 5$ de um pentapeptídeo GX SXG altamente conservado, formando uma característica principal $-\beta$ em torno de α'' , designada como a cavidade nucleofílica (PETERSEN, 1996; JAEGER; REETZ, 1998). O sítio é composto de uma folha β central consistindo de 8 diferentes fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas com seis α hélices (A-F) (PETERSEN, 1996) (Figura 1).

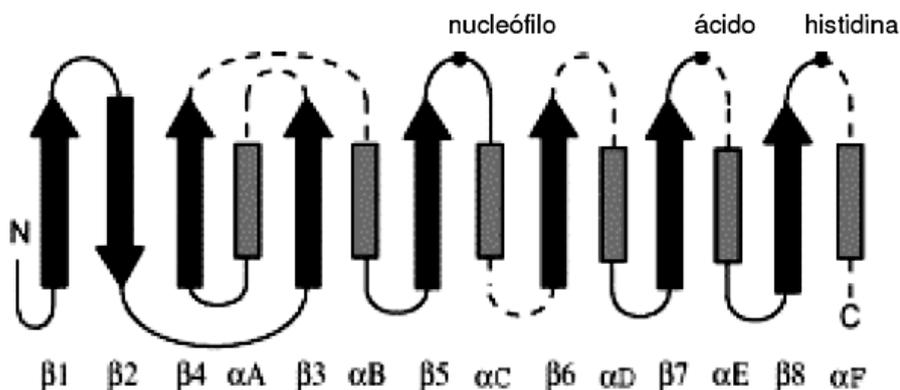


Figura 1. Modelo estrutural do sítio ativo de α/β hidrolases (POUDEROYEN et al., 2001).

O mecanismo envolvido na hidrólise catalisada pelas lipases é ilustrado na Figura 2. No primeiro passo, a serina é ativada por desprotonação. Consequentemente, a nucleofilicidade dos resíduos hidroxil da serina é reforçada e ataca o grupo carbonil da ligação éster da cadeia do substrato formando um intermediário acil-enzima. O anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. O intermediário tetraédrico é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos. Um álcool é liberado, deixando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (JAEGER et al., 1994; REIS et al., 2009).

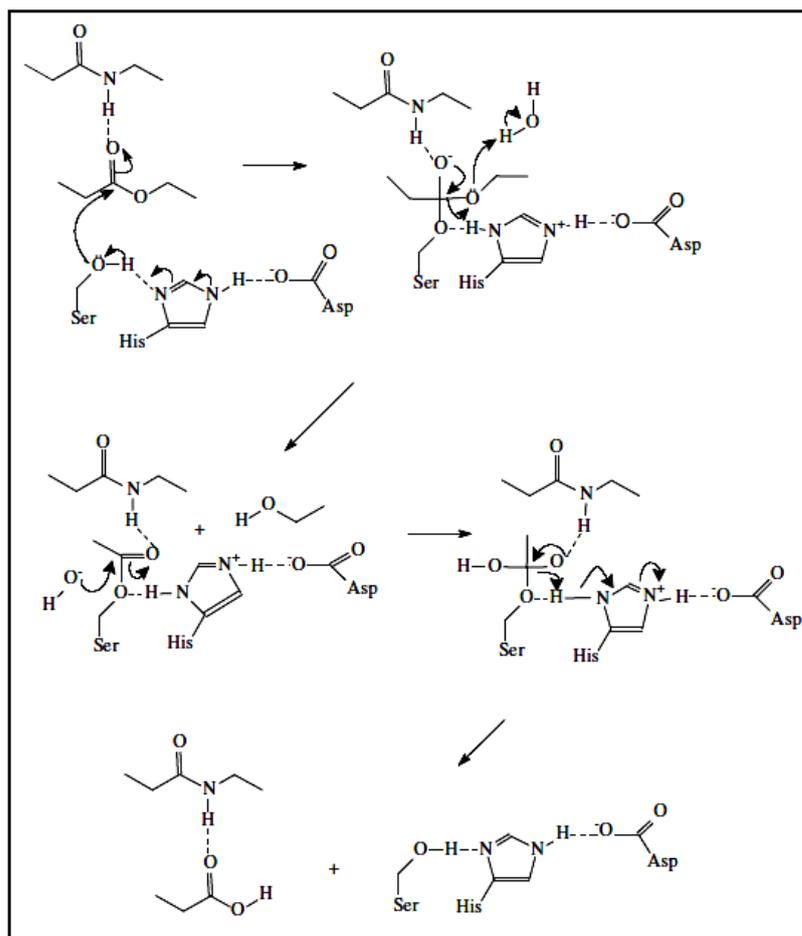


Figura 2: Mecanismo da hidrólise pelas lipases (JAEGER et al., 1994)

O sítio ativo da maioria das lipases conhecidas é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou *lid*). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta deixando o sítio ativo acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase à interface (PETERSEN, 1996; JAEGER; REETZ, 1998).

Este fenômeno é referido como “ativação interfacial”. Logo, as lipases preferencialmente atuam em interface água-óleo, ou água-solvente orgânico, e a “ativação interfacial” relaciona o aumento da atividade da lipase em função de substratos insolúveis, ou seja, as lipases atuam preferencialmente em substratos emulsão (BRZOZOWSKI, et al., 1991; JAEGER; REETZ, 1998; SHARMA et al., 2001).

O fenômeno da ativação interfacial foi descrito por Holwerda et al. (1936) e Schönheyder e Volqvartz (1945). Medindo a atividade da lipase pancreática frente a tricaproína, os autores observaram que a hidrólise era enormemente aumentada quando a concentração do substrato excedia o limite de solubilidade. Este comportamento foi chamado de ativação interfacial. Em 1958, Sarda e Desnuelle, repetindo os experimentos de Holwerda et al. (1936) e Schönheyder e Volqvartz (1945), observaram que esterases eram ativas somente sobre substratos molecularmente dispersos, enquanto lipases constituíam uma classe especial de esterases que apresentavam maior atividade sobre substratos formando agregados plurimoleculares. Desta forma, foi postulado que o fenômeno da ativação interfacial seria uma característica das lipases que as distinguiria de outras esterases. Com a descrição tridimensional de algumas lipases, a *lid* foi correlacionada ao fenômeno da ativação interfacial. A abertura da *lid* e conseqüentemente a ativação da lipase seriam favorecidas pela interação da *lid* hidrofóbica com a interface formada por substratos agregados ou micelizados.

Ferrato et al. (1997) revisaram o fenômeno da ativação interfacial e observaram que a ativação em presença de interfaces varia de acordo com a enzima empregada e com substratos e condições experimentais. Além disso, segundo os autores, nem a presença da *lid* nem a ativação interfacial são características genéricas de todas as lipases.

Recentemente, revelou-se que a presença dessa estrutura em forma de tampa nem sempre está correlacionada com a ativação interfacial. Lipases de origem microbiana (*Pseudomonasaeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B) e uma lipase pancreática não específica não mostraram ativação interfacial, embora apresentem uma “tampa” anfifílica cobrindo seus sítios ativos. Esta observação sugere que a presença de uma tampa dominante e a ativação interfacial não são critérios adequados para classificar uma enzima como lipase. Portanto, a definição mais aceita é a seguinte: uma lipase é uma carboxiesterase que catalisa a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (JAEGER; REETZ, 1998).

Embora muitos aspectos do mecanismo catalítico das lipases ainda não estejam esclarecidos, os dados estruturais das lipases permitem algumas conclusões: a) a maioria das lipases sofre profundas mudanças estruturais durante a ativação interfacial; a *lid* se move deixando a enzima na forma aberta e ativa, expondo uma grande superfície hidrofóbica de interação lipídeo-proteína; b) a abertura da *lid* pode ser

facilitada por solventes orgânicos, provavelmente por diminuição da constante dielétrica do meio; c) a interação lipídeo-proteína provavelmente é complexa, não podendo ser explicada por modelos cinéticos simples (BRZOZOWSKI et al., 1991).

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial (FABER, 1997; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). As lipases podem mostrar tiposeletividade, regioseletividade e estereoseletividade em suas reações com triacilgliceróis (VILLENEUVE et al., 1996; MURALIDHAR et al., 2002). A tiposeletividade ocorre quando uma lipase é específica para um ácido graxo em particular (ou um grupo de ácido graxo), hidrolisando um tipo particular de éster de ácido graxo.

A regioseletividade ocorre quando a lipase é capaz de hidrolisar grupos de éster carboxílicos primários nas posições *Sn*-1 e *Sn*-3, mas não posição *Sn*-2. Nessa classificação, as lipases podem ser divididas em três grupos:

- Lipases não específicas (ex: produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp.) hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2 (Figura 4). Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior (JENSEN et al., 1990; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998).

- Lipases 1,3 específicas (ex: de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*) hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3 (Figura 3). (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; WILLIS; MARAGONI, 1999).

- Lipases 2 - específicas são lipases que hidrolisam as ligações éster na posição 2 do triacilglicerol.

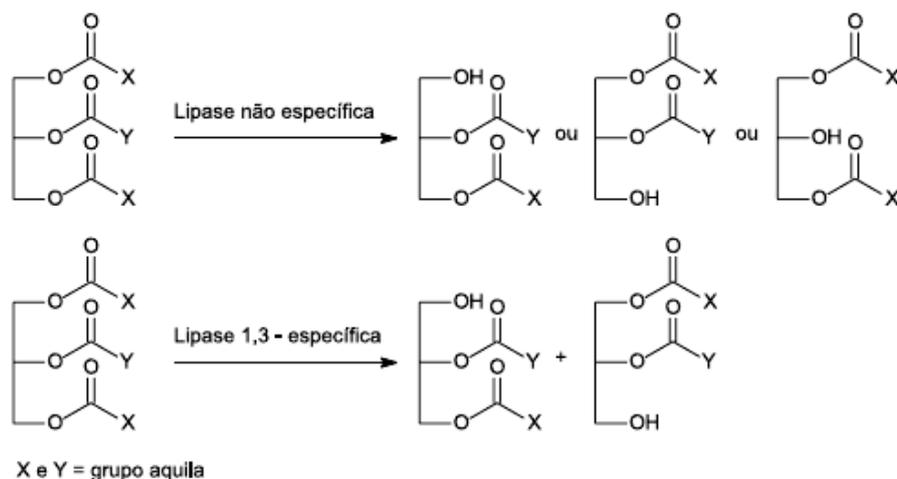


Figura 3: Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e do tipo 1,3 específica.

A estereoseletividade ocorre quando a lipase é capaz de diferenciar entre dois enantiômeros em um substrato racêmico (MITCHELL et al., 2008).

1.2 Fontes para obtenção das lipases

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e vegetais e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de micro-organismos. Em eucariotos, as lipases estão envolvidas em vários estágios do metabolismo incluindo digestão de gordura, absorção, reconstituição e metabolismo de lipoproteínas. Em plantas, as lipases são encontradas em tecidos de reserva de energia (SHARMA, et al., 2001) e as sementes oleaginosas provavelmente usam esta enzima durante os primeiros estágios de germinação, iniciando a metabolização de triglicerídeos estocados através da hidrólise dos ácidos graxos. Os ácidos graxos liberados são levados às vias de produção de energia e assim, fornecem energia para o crescimento do embrião (STAUBMANN et al., 1999).

Enzimas microbianas são geralmente mais utilizadas que as enzimas derivadas de plantas ou animais devido à grande variedade de atividade catalítica disponível, ao alto rendimento possível, à fácil manipulação genética, ao fornecimento regular devido à ausência de flutuações sazonais e ao rápido crescimento dos micro-organismos com baixo-custo. Enzimas microbianas também podem ser mais estáveis que as correspondentes em plantas e animais e sua produção é mais conveniente e segura (WISEMAN, 1995).

As fontes fúngicas têm sido preferencialmente utilizadas, não necessariamente devido às suas melhores características em relação às lipases bacterianas, mas sim porque na sua grande maioria não são nocivas à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS - Generally Regarded as Safe (JAEGER et al., 1994). Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roqueforti* e da levedura *Candida rugosa*.

Dentre as bactérias produtoras de lipases, comercialmente estão disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia* (anteriormente *Pseudomonas*) *cepacia* para a aplicação em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp. utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis. O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas (JAEGER et al., 1999).

1.3 Reações catalisadas pelas lipases

As lipases catalisam uma série de diferentes reações (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; VILLENEUVE et al., 2000). Além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (síntese de éster) (GANDHI, 1997; YAHYA et al., 1998). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa seqüência lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (Figura 4) (VULFSON 1994; WOOLLEY; PETERSEN, 1994; BALCÃO et al., 1996). Sob determinadas condições, a quantidade de água na reação determina a direção da reação catalisada pela lipase. Quando há pouca ou nenhuma quantidade de água, somente a esterificação ou a transesterificação são favoráveis. A hidrólise é favorecida quando existe um excesso de água (KLIBANOV, 1997).

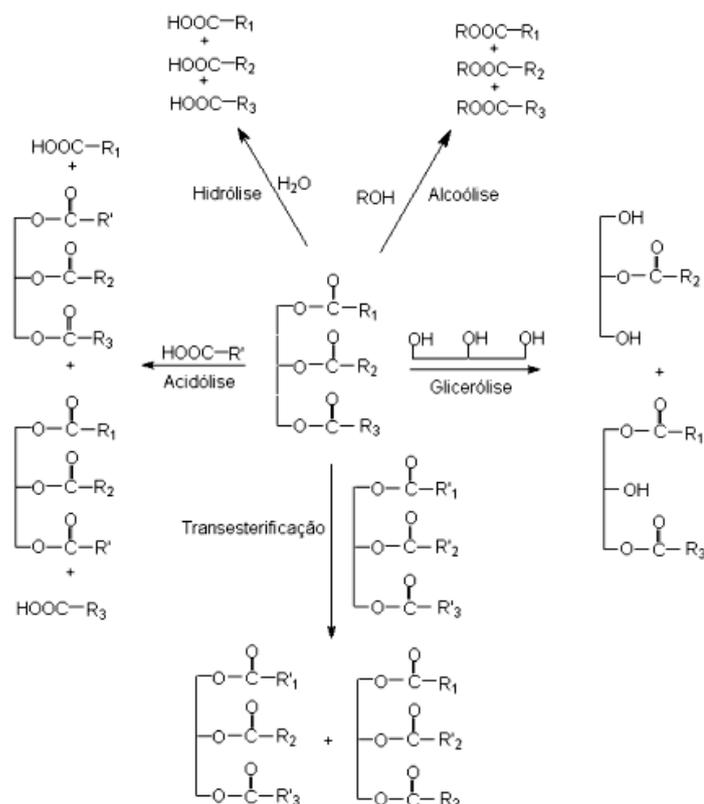


Figura 4: Reações catalisadas por lipases (REIS et al., 2009)

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta reação ocorre via hidrólise seqüencial dos grupos acila no glicerídeo, de tal forma que, num dado momento, a mistura reacional contém não somente triglicerídeo, água, glicerol e ácidos graxos, como também diacilgliceróis e monoacilgliceróis (HARALDSSON, 1991; GANDHI, 1997). O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos graxos (MACRAE; HAMMOND, 1985; WILLIS; MARAGONI, 1999).

A interesterificação é o processo mais usado para a obtenção de óleos e gorduras com funções desejáveis na manufatura de produtos específicos. Esse processo consiste em um rearranjo na molécula de glicerol possibilitando modificações das propriedades dos óleos e gorduras, por meio de um catalisador que, em sua forma ativa, promove a separação dos ácidos graxos da cadeia inicial.

Na reação de transesterificação, os triglicerídeos reagem com álcool na presença do catalisador. A forma simplificada dessa reação química é apresentada na Figura 5,

onde R1, R2 e R3 são hidrocarbonetos de cadeia longa. Normalmente, existem cinco tipos de cadeias nos óleos vegetais e animais: palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico. Geralmente, o metanol é o álcool preferido para a produção de biodiesel devido ao seu baixo custo.

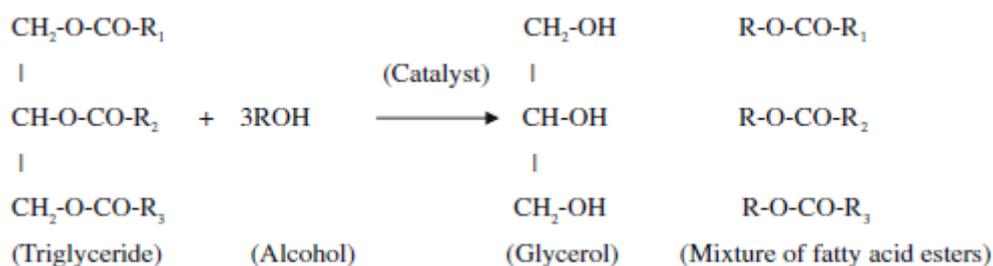


Figura 5: Reação de transesterificação catalisada pelas lipases (LEUNG et al., 2010)

1.4 Aplicações industriais das lipases

Enzimas lipolíticas estão atraindo uma enorme atenção devido ao seu potencial biotecnológico (BENJAMIN; PANDEY, 1998). Elas constituem a principal classe de enzimas empregadas na indústria, sendo que as lipases se diferenciam por catalisar reações de síntese, além das suas reações hidrolíticas naturais sobre lipídeos, o que as tornam atrativas para aplicações em segmentos industriais bastante diversificados. Abaixo serão listadas algumas das principais aplicações das lipases no setor industrial.

a) Indústria de detergentes

O uso de lipases como aditivos em detergentes ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas (KIRK et al., 2002). Devido à sua capacidade em hidrolisar gorduras, as lipases são mais aplicadas nesse setor industrial. O tipo de lipase adequada para ser utilizada na indústria de detergentes possui as seguintes características: baixa especificidade de substratos (habilidade em hidrolisar óleos e gorduras de vários compostos); habilidade para suportar condições do processo de lavagem (pH 10 – 11, temperatura 30- 60°C); capacidade para suportar surfactantes e outras enzimas (proteases), que são importantes ingredientes de muitos detergentes.

b) Indústria de alimentos

Óleos e gorduras são componentes importantes dos alimentos. O valor nutricional e sensorial e as propriedades físicas de um triglicerídeo são fortemente influenciados por fatores como a posição dos ácidos graxos no glicerol, o comprimento da cadeia do ácido graxo, e seu grau de insaturação. O uso das lipases pode modificar as propriedades dos lipídios, alterando a localização de cadeias de ácidos graxos no glicerídeo e substituindo um ou mais ácidos graxos. Desta forma, um lipídio relativamente barato e menos desejável pode ser modificado para um valor mais elevado de gordura (COLMAN; MACRAE, 1980; PABAI et al., 1995a,b; UNDURRAGA et al., 2001).

A hidrólise seletiva da gordura do leite é um outro exemplo de aplicação potencial de lipases. Segundo Balcão e Malcata (1998), o declínio do consumo *per capita* de gordura de leite em diversos países e a demanda por leite e derivados com menor teor de gordura têm aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o uso desta gordura. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo Cheddar, para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos.

Produtos deste tipo de gordura têm sido extensivamente utilizados em cereais, molhos, aperitivos e assados em geral (um exemplo clássico é o uso em pipocas), resultando em produtos com melhor aroma e maior aceitabilidade pelos consumidores. A adição desses hidrolisados aos alimentos confere uma variedade de efeitos organolépticos e é dependente da quantidade empregada. Em níveis baixos, nenhum aroma de ácido graxo livre no alimento é detectável, ocorrendo apenas um enriquecimento característico no aroma; conforme o teor dessa adição é aumentado, um aroma semelhante à manteiga começa a ser detectado e, em presença de elevados níveis, o aroma sugere queijo (BALCÃO; MALCATA, 1998).

As características dos hidrolisados dependem da fonte da lipase utilizada, sendo adequadas as enzimas oriundas do leite (lipase lipoprotéica), pâncreas (lipase pancreática), fungos (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roquefortii*), bactérias (*Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas fluorescens*) e trato gastrointestinal (BALCÃO; MALCATA, 1998).

Outro campo de aplicação de lipase na indústria de alimentos, com boa perspectiva de crescimento, é no setor de panificação. O uso de lipase 1,3-específica tem um excelente efeito condicionador da massa, facilitando o seu manuseio em máquinas convencionais da indústria de panificação. Além disso, aumenta o volume do pão, melhora a textura do miolo e confere ao mesmo uma cor mais branca. Nesta aplicação, a lipase degrada os lipídeos do trigo, modificando sua interação com o glúten, permitindo que o glúten obtenha uma rede mais forte e mais elástica (SI, 1997).

Um dos mais importantes usos da lipase, em processos de interesterificação de óleos e gorduras, é o aproveitamento de óleos de baixo custo para produção de análogos de manteiga de cacau (VULFSON, 1994; WOOLLEY; PETERSEN, 1994; FACIOLI; GONÇALVES, 1998; UNDURRAGA et al., 2001; KHUMALO et al., 2002). A manteiga de cacau é um tipo de aditivo, que confere ao chocolate as características necessárias de cristalização e fusão. Geralmente, os produtos de chocolate contêm 30% de manteiga de cacau. Esta, tendo um custo bem elevado, levou o setor alimentício a buscar soluções mais econômicas para a sua substituição no processo, tendo os chamados análogos de manteiga de cacau alcançando uma posição de destaque, sob o ponto de vista técnico e econômico, para aplicação na produção de chocolates e seus derivados (FACIOLI; GONÇALVES 1998; UNDURRAGA et al., 2001; KHUMALO et al., 2002).

c) Indústria de papel e celulose

O ‘_Pitch’ (termo utilizado para descrever todo tipo de material hidrofóbico da madeira, principalmente triglicerídeos e ceras), causa graves problemas na manufatura de papel e celulose (JAEGER; REETZ, 1998). As lipases são usadas para remover o pitch da celulose produzida para fabricação de papel. Uma indústria de papéis chamada Nippon, no Japão, tem desenvolvido um método para controle do pitch que usa lipase de *Candida rugosa* para hidrolisar até 90% dos triglicerídeos da madeira. (JAEGER; REETZ, 1998).

d) Tratamento de efluentes

As lipases podem ser utilizadas para a remoção de óleo presente nas águas residuárias de fábricas, restaurantes e residências, ou proveniente de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e águas (JAEGER; REETZ, 1998; PANDEY et

al., 1999; CAMMAROTA et al., 2001). Existem experiências descritas sobre o cultivo de microrganismos lipofílicos em águas residuárias para a remoção de filmes de gordura (DEFELICE et al., 1997, VITOLO et al., 1998). As lipases também podem ser utilizadas na remoção de depósitos de gordura que se formam em sistemas de tubulação de água quente, bebidas ou alimentos líquidos (PANDEY et al., 1999).

A aplicação de lipases tem sido também preconizada na degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais gerados em frigoríficos, abatedouros, laticínios e indústrias de alimentos em geral (LIE; MOLIN, 1991; GANDHI, 1997; PANDEY et al., 1999). Estas indústrias produzem um elevado teor de resíduos líquidos e sólidos, com odores desagradáveis, que prejudicam intrínseca e extrinsecamente as unidades industriais.

Neste contexto, processos alternativos que visam a recuperação ou diminuição da carga de gorduras de efluentes são de extremo interesse para a indústria. Um tratamento preliminar desses efluentes por meio da ação das lipases reduz o teor de lipídeos, o diâmetro das partículas de gorduras em até 60% e o tempo de residência do efluente nas lagoas de estabilização (MASSE et al., 2001; LEAL et al., 2002). O uso de lipases em tratamento de efluentes fornece várias vantagens potenciais, entre as quais destacam-se a simplicidade e facilidade no controle do processo; não há necessidade de aclimatação de biomassa; não há efeitos de choque por carga de poluentes; aplicação em processos com baixa ou alta concentração de poluentes; operação em amplas faixas de pH, temperatura e salinidade (KARAM; NICELL, 1997).

e) Síntese orgânica

As lipases são usadas em uma grande variedade de reações quimio-, regio-, e estereosseletiva (RUBIN; DENNIS, 1997b; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; BERGLUND; HUTT, 2000). A maioria das lipases usadas como catalisadores na química orgânica são de origem microbiana. A enzima catalisa a hidrólise de triglicerídeos imiscíveis em água na interface.

f) Síntese de ésteres

Ésteres originados de ácidos graxos de cadeia curta possuem aplicações na indústria de alimentos. Metil e etil ésteres de ácidos de cadeia longa são utilizados na indústria de biocombustíveis (VULFSON, 1994). Uma das aplicações mais

interessantes para a lipase consiste na produção de biodiesel, o qual tem ganhado importância nos últimos anos devido a sua habilidade em substituir os combustíveis fósseis que são susceptíveis de se esgotarem dentro de um século. Além disso, o biodiesel é mais vantajoso ecologicamente em relação aos combustíveis fósseis (RANGANATHAN, 2008). Na produção de biodiesel por métodos enzimáticos, catalisados por muitas lipases, algumas desvantagens como formação de sabões, pigmentos, entre outras decorrentes da catálise química, podem ser eliminadas e, assim, os processos enzimáticos são alternativas promissoras (ANTCZAK et al., 2009).

g) Indústria de cosméticos

As lipases podem ser utilizadas para a produção de isopropil miristato, isopropil palmitato e 2-etil-hexil-palmitato que são encontrados nos cremes de pele, bronzeadores, óleos de banho, etc. O uso da enzima no lugar do catalisador ácido origina produtos com maior qualidade. Retinóides (vitamina A e derivados) são bastante utilizados neste setor industrial. Derivados de retinol dissolvidos em água são preparados pela reação catalítica da lipase imobilizada (MAUGARD et al., 2002).

h) Lipases em processamento de chá

A qualidade do chá preto é dependente da desidratação, quebra mecânica e fermentação enzimática a que são submetidos os brotos de chá. Durante a manufatura do chá preto, a etapa enzimática desarranja as membranas lipídicas para iniciar a formação de produtos voláteis que fornecem o sabor característico do produto enfatizando a importância do lipídeo no desenvolvimento do aroma. Lipases produzidas pelo *Rhizomucor miehei* aumentam o nível de ácidos graxos poli-insaturados observados pela redução do conteúdo total de lipídeos (LATHA; RAMARETHINAM et al. 1999).

2. Imobilização de enzimas e células

A especificidade de uma enzima envolve a discriminação entre substratos (especificidade pelo substrato), entre partes similares da molécula (regioespecificidade) e entre isômeros ópticos (estereoespecificidade) (SEEGER et al., 1999; VAN DER WERF et al., 1999; ADELTE et al., 2003; WOLOSOWSKA; SYNOWIECKI, 2004;

ERICKSEN et al., 2005; JU; PARALES, 2006), e essas características conferem à esses catalisadores uma alta eficiência para diversas aplicações como citadas anteriormente.

Embora as vantagens das enzimas sejam muitas, suas utilizações em processos industriais têm sido limitada, devido a: baixa estabilidade nas condições de operação; elevado custo de obtenção da enzima, desde o isolamento até a purificação, e dificuldade técnica e do elevado custo para a separação do substrato e produto, ao final da reação. Isto restringe o emprego das enzimas solúveis, essencialmente em processos em batelada, onde a mistura substrato – enzima permanece em contato pelo tempo necessário para se atingir um determinado grau de conservação. Ao final do processo, a eliminação da enzima e de outras proteínas é realizada por meio de variações de pH ou tratamento térmico. Estes processos desnaturam a enzima, provocando a perda da atividade e impedindo sua reutilização em bateladas posteriores.

Neste contexto, algumas pesquisas têm ganhado importância no intuito de aproveitar mais o potencial das enzimas, ligando-as em suportes sólidos insolúveis ao meio reacional, ou tornando-as insolúveis por meio de reações entre seus grupos químicos. Estes processos são conhecidos como imobilização de enzimas.

Enzimas imobilizadas são definidas como –enzimas confinadas fisicamente ou localizadas em uma região definida de um suporte, com retenção de sua atividade catalítica, e que pode ser usado repetida e continuamente” (JEGANNATHAN et al., 2008).

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são, praticamente, aquelas relativas à catálise heterogênea: aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo, uma vez que a enzima não deve ser desnaturada ao final do processo de batelada; operar de forma contínua possibilitando um maior controle das variáveis do processo, pois o catalisador é retido no interior do bioreator e o substrato passa pelo leito catalítico em escoamento contínuo, ou transfere-se o biocatalisador para novas bateladas contendo solução de substrato novo (processo em bateladas repetidas); facilitar a separação do catalisador e do produto da reação, visto que a enzima imobilizada, por estar na forma insolúvel ao meio reacional, é retida no interior do bioreator e o substrato que não reagiu e produtos são retirados sem contaminação com o biocatalisador; reduzir o volume de reação, pois a enzima estando imobilizada e retida no bioreator permite uma alta concentração enzimática em menor volume de reator, isto é, uma alta atividade por

unidade de volume, muito superior à que seria obtida com a enzima livre; alterar, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação à sua forma solúvel, como por exemplo, conferir maior estabilidade ao pH e a temperatura, reduzir os efeitos de inibição pelo substrato e produto, pois estes são removidos continuamente do biorreator; facilitar a interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão, pela remoção do biocatalisador (HARTMEIER, 1988; MESSING, 1975; RESEVEAR et al., 1987).

Existem vários métodos de imobilização para lipases (Figura 6) incluindo adsorção, ligação covalente e encapsulação. A adsorção é a fixação da lipase em uma superfície por forças fracas como Van der Waals ou interações hidrofóbicas. (JEGANNATHAN et al., 2008). Na imobilização por ligações covalentes a enzima se liga irreversivelmente a um suporte sólido (TREVAN, 1988a,b). No método de encapsulação, ocorre a captura da enzima em uma matriz polimérica (JEGANNATHAN et al., 2008).

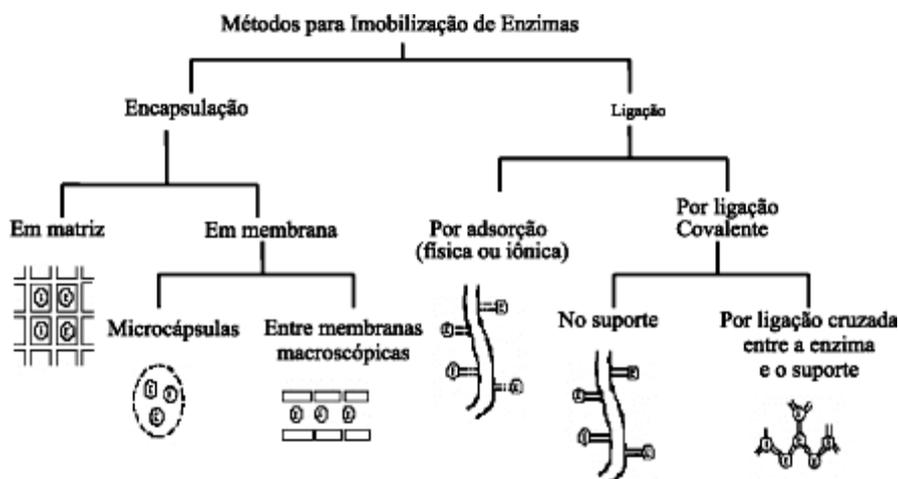


Figura 6: Métodos de imobilização de enzimas (DALLA-VECCHIA et al. 2004)

Nesse trabalho a lipase de *Myceliophthora* sp F 2.1.4 foi imobilizada pelo método de encapsulação utilizando o polímero alginato de sódio e por ligações covalentes utilizando o polímero quitosana. O alginato é extraído de algas marrons do tipo *Phaeophyceae* (HERTZBERG et al., 1992). Ele é constituído por dois ácidos urônicos, o gulurônico (G) e o manurônico (M) e tem a propriedade de formar gel em contato com cátions di e multivalentes. Os resíduos podem estar dispostos

continuamente, formando blocos homopoliméricos ou alternadamente, formando blocos heteropoliméricos (Figura 7). Os cátions polivalentes ligam-se ao polímero sempre que há dois resíduos do ácido gulurônico, e a geleificação, que consiste na troca de íons, depende da disponibilidade desses resíduos (SMIDSROD; DRAGET, 1996) (Figura 8).

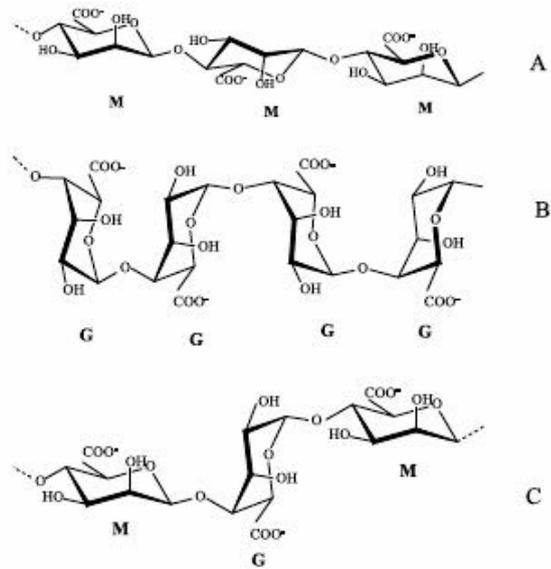


Figura 7: Representação da estrutura do alginato. (A) blocos homopoliméricos de resíduos M; (B) blocos homopoliméricos de resíduos G; (C) blocos heteropoliméricos de resíduos M e G.

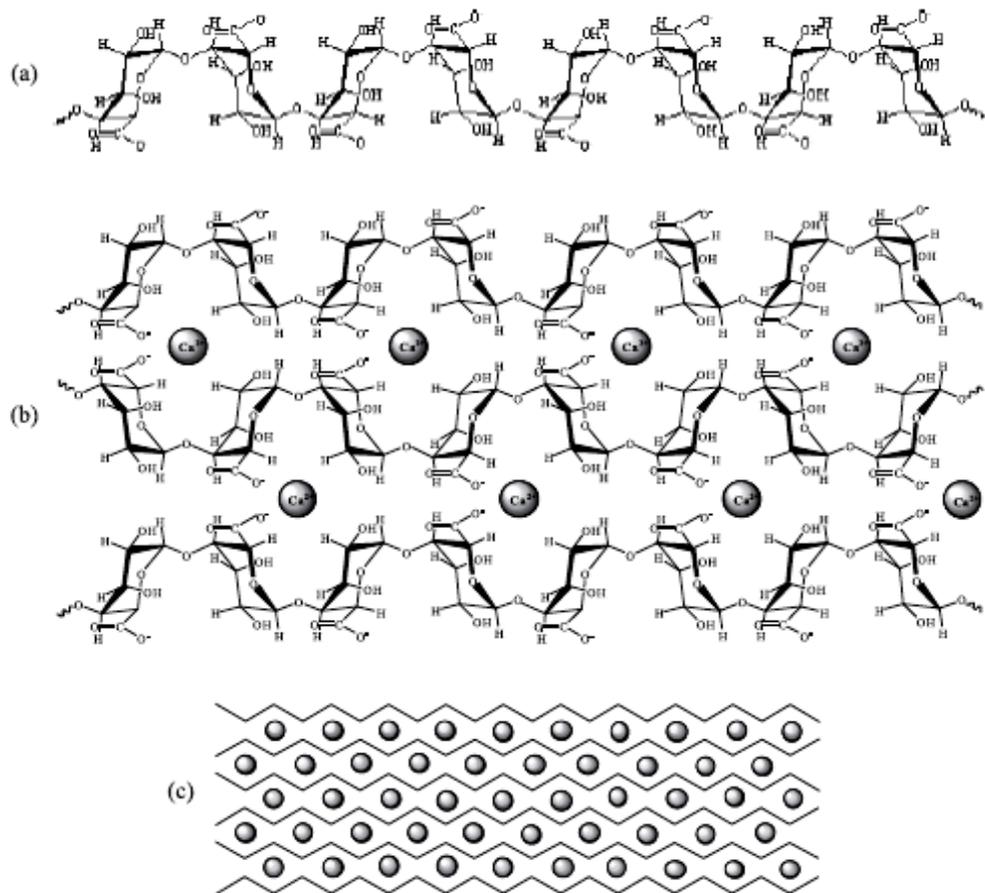


Figura 8: Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidade de ácido gulurônico em solução; (b) ligação entre as cadeias homopoliméricas por meio dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas por meio dos íons cálcio (KAWAGUTI; SATO, 2008).

A quitosana (Figura 9) é um biopolímero obtido pela desacetilação alcalina da quitina (um polímero composto de unidades de acetilglicosamina). A quitina está presente nos exoesqueletos dos crustáceos, nas cutículas dos insetos e nas paredes celulares de muitos fungos (ROBERTS, 1992).

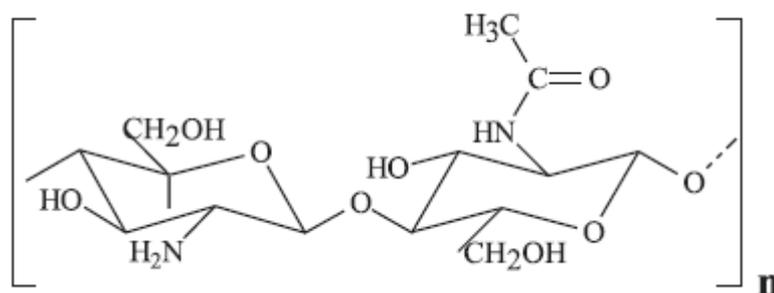


Figura 9: Estrutura da quitosana (JANEGITZ et al., 2007)

A preparação de um hidrogel contendo quitosana covalentemente ligada requer a quitosana e um crosslinker em um solvente apropriado, geralmente água. Os crosslinkers são moléculas com pelo menos dois grupos reativos funcionais que permitem a formação de pontes entre as cadeias poliméricas (BERGER et al., 2004). Atualmente, o crosslinker mais comumente usado são os dialdeídos como glioxal (PATEL; AMIJI, 1996; KJALID et al., 1999) e principalmente o glutaraldeído (ALY, 1998; YAMADA et al., 2000; DENKBAS et al., 2000). Ocorre, então, uma reação do grupo aldeído formando uma ligação covalente com o grupo amino da quitosana (MONTEIRO; AIROLDI, 1999; YAO et al., 1995).

Outro método biotecnológico de uso cada vez mais freqüente é o de imobilização de células que além de eliminar a necessidade de purificação e passos de extração da enzima, também proporciona maiores rendimentos da atividade enzimática, maior estabilidade operacional, maior resistência a perturbações ambientais e baixo custo (KIERSTAN; COUGHLAN, 1985).

Estudos mostraram que ambos os métodos – imobilização da enzima e da célula – são altamente eficientes quando comparados ao uso da enzima na sua forma livre (RANGANATHAN et al., 2008).

3. Fermentação em estado sólido e submersa

Existem três técnicas de fermentação para a produção de lipase: fermentação em estado sólido (FES), fermentação submersa (FSm) e fermentação com células imobilizadas (BENJAMIN; PANDEY, 1997; ELIBOL; OZER, 2002; ELIBOL; OZER, 2000). A última pode ser considerada como uma derivação da FSm já que é preparada da mesma forma, diferenciando somente por ter cubos de esponjas de poliuretano adicionadas ao meio. Entretanto essa técnica apresenta algumas vantagens já que é um fácil caminho para reduzir o tempo de duração da fermentação em batelada repetida, devido à diminuição do tempo necessário para o crescimento celular (YANG et al., 2005).

Dessa forma, podemos dividir os processos fermentativos em fermentação em estado sólido e fermentação submersa.

A maior diferença entre esses dois bioprocessos é a quantidade de água livre no substrato. No caso da fermentação submersa, a quantidade de substância sólida raramente alcança mais que 50 g/L, enquanto isso na fermentação em estado sólido a

parte sólida apresenta tipicamente entre 20 a 70% do total de peso. Mais especificamente, a FES é definida pela ausência ou quase ausência de água livre nos espaços entre as partículas sólidas. Já que os micro-organismos necessitam de água para o crescimento, na FES eles obtêm água da umidade dentro do substrato.

Outra diferença importante entre esses dois processos refere-se ao crescimento dos micro-organismos. Na FSm todos os substratos estão livremente acessíveis aos micro-organismos, enquanto que na FES os substratos que estão realmente disponíveis aos micro-organismos podem aumentar, diminuir ou permanecer relativamente constantes durante a fermentação (KNAPP; HOWELL, 1977). Isto é devido a uma complexa interação de diversos fatores incluindo a produção e difusão de enzimas hidrolíticas extracelulares, a difusão de produtos hidrolíticos e a penetração dos micro-organismos no substrato (MITCHELL et al., 1991; VARZAKAS, 1998).

Os substratos utilizados na FES são tipicamente produtos derivados da agricultura ou produtos derivados da transformação de produtos agrícolas. Os exemplos incluem grãos de arroz, tubérculos de mandioca, soja, farelos de arroz e de trigo, farinha de milho e de arroz, bagaço de cana de açúcar, entre outros. Esses substratos podem requerer preparações ou pré-tratamentos que visam o aumento da susceptibilidade de macromoléculas para um melhor ataque das enzimas microbianas, além disso os substratos podem ser picados para facilitar a acessibilidade do interior das partículas aos micro-organismos (MITCHELL et al., 2000).

Os fungos filamentosos são o grupo de micro-organismos mais indicados para serem utilizados em FES devido ao modo de crescimento das hifas (que se espalham radialmente), que permite ao fungo acessar nutrientes localizados no interior do substrato.

A fisiologia dos fungos também os habilita aos processos de FES. Os fungos crescem bem em sistemas com baixa quantidade de água disponível e em valores de pH baixos. Em alguns sistemas de FES é possível fazer a combinação de baixa quantidade de água e baixo pH para criar um ambiente que é favorável para o crescimento fúngico e ao mesmo tempo, impedir o crescimento de muitas bactérias e leveduras. Os fungos filamentosos também podem produzir uma variedade de enzimas hidrolíticas para degradar as macromoléculas encontradas nos substratos sólidos. As amilases e as celulases são as mais importantes enzimas que ajudam no crescimento em substratos de

origem agrícola, apesar de existir também as proteases e as lipases que ajudam na degradação e penetração.

Apesar de inúmeras vantagens a FES não é amplamente utilizada em escala industrial devido ao insucesso do aumento de escala já que fatores como temperatura, umidade, concentração de substrato não são constantes em todo o processo fermentativo. A inter-relação entre fatores ambientais com a quantidade de oxigênio, nível de mistura e a temperatura contribuem para dificultar a regulação desses parâmetros. O crescimento dos micro-organismos em condições aeróbias no biorreator resulta em uma produção considerável de calor que causa um rápido aumento na temperatura. Esse efeito, o qual é desejável no processo de compostagem, é geralmente fatal para os processos biotecnológicos já que grande parte das enzimas produzidas durante a fermentação podem ser desnaturadas com o calor no final do processo (DOS SANTOS et al., 2004).

Do ponto de vista biológico, a FES se assemelha muito ao habitat natural dos micro-organismos e, portanto, é um ótimo ambiente para o seu crescimento e para a geração de produtos. Além disso, os resíduos agrícolas utilizados na FES são cruciais para a viabilidade econômica do processo e podem contribuir para a eliminação desses resíduos que são grandes poluidores ambientais (SINGHANIA et al., 2009).

Várias estratégias têm sido estudadas para aumentar o rendimento da produção de enzimas nas fermentações. As condições de crescimento como disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio, a presença de ativadores, estimuladores, inibidores, surfactantes, temperatura de incubação, pH e a quantidade de inóculo (HADEBALL, 1991) e tensão de oxigênio (CHARTRAIN et al., 1993) podem influenciar a síntese de lipase.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção da lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp n^o F 2.1.4, por FES, FSm e por fermentação semi-sólida. Essa parte do trabalho é mostrada no capítulo 2. Além disso, tendo em vista a aplicação da lipase é necessário o estudo das condições que promovam melhor atuação da enzima. Assim, a caracterização parcial da lipase e sua imobilização são mostradas no capítulo 3.

OBJETIVOS

- Determinação das melhores fontes de carbono, nitrogênio, tipo de indutor da enzima e quantidade de esporos para produção da lipase em FES.
- Avaliação dos diferentes eluentes para extração da enzima.
- Produção da lipase em FSm utilizando meio preparado com base nos resultados dos ensaios de fonte de carbono, nitrogênio e indutor feitos com FES.
- Produção da lipase por fermentação semi-sólida utilizando bucha vegetal e meio nutriente preparado com base nos dados da FES.
- Caracterização da enzima quanto ao pH, temperatura de atividade e quanto à estabilidade a diferentes pHs e temperaturas.
- Avaliação dos efeitos de solventes, íons, detergentes, substratos sintéticos e naturais sobre a atividade da lipase.
- Imobilização da lipase em alginato de cálcio e em quitosana e avaliar o efeito dessa imobilização sobre a possibilidade de reutilização e sobre a estabilidade térmica.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADELTE, S.; PODESCHWA, M.; DALLMANN, G.; ALTENBACH, H.J.; VOGEL, G. Stereo and regiospecificity of yeast phytases chemical synthesis and enzymatic conversion of the substrate analogues *neo* and L-chiro-inositol hexakisphosphate. **Bioorg. Chem**, v. 31, p. 44–67, 2003.

ALY, A.S.; Self-dissolving chitosan. I. Preparation, characterization and evaluation for drug delivery system. **Angew. Makromol. Chem**, v. 259, p. 13–18, 1998.

ANTCZAK, S.A.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review - Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194, 2009.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamentals. 2 ed. New York, Mc Graw Hill, 1986.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X.; Bioreactors with lipases: State of the art. **Enzyme Microb. Technol**, v. 18, p. 392, 1996

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X.; Lipase catalized modification of milkfat. **Biotechnol. Adv**, v. 16, p. 309, 1998.

BENJAMIN S.; PANDEY A. Coconut cake: a potent substrate for the production of lipase by *Candida rugosa* in solid-state fermentation. **Acta Biotechnol**, v. 17, p. 241–51, 1997.

BENJAMIN S.; PANDEY A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. **Yeast**, v.14, p.1069–87, 1998.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm**, v. 57, p. 35–52, 2004.

BERGLUND, P.; HUTT, K. Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases. In: Patel RN, editor. Stereoselective biocatalysis. New York: Marcel Dekker, 2000.

BROCKMAN, H.; MOMSEN, W.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. **Journal of American oil chemist's society**, v. 65, p. 891, 1988.

BRZOSOWSKI, A.M.; DEREWENDA, U.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, G.G.; LAWSON, D.M.; TURKENBURG, J.P.; BJORKKLING, F.; HUGE-JENSEN, B.; PATKAR, S.A.; THIM, L. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, p. 491 – 494, 1991.

CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic prehydrolysis

and anaerobic degradation of wastewaters with fat contents. **Biotechnol. Lett**, v. 23, p. 1591-1595, 2001.

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

COLMAN, M. H.; MACRAE, A. R. UK Patent No. 1577933, 1980.

CHARTRAIN, M.; KATZ, L.; MARCIN, C.; THIEN, M.; SMITH, S.; FISHER, E.; GOKLEN, K.; SALMON, P.; BRIX, T.; PRICE, K. e GREASHAM, R. Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. **Enzyme Microb. Technol.**, in press. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 76, p. 487 – 492, 1993.

DE FELICE, B.; PONTECORVO, G.; BERDAGUE, J.L. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. **Acta Biotechnol**, v. 17, p.231-239, 1997.

DENKBAS, E. B.; SEYYAL, M.; PISKIN, E. Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning. **J. Membr. Sci.**, v. 172, p. 33–38, 2000.

DIXON, M.; WEBB, E.C. *Enzyme*, 3 ed. London, Longman Group Limited, cap 2. 1979.

DORDICK, J. *Biocatalysts for industry*. New York, Plenum Press., 1991.

DOS SANTOS, M. M.; SOUZA DAS ROSA, A.; DAL'BOIT, S., MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N: Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? **Bioresour Technol**, v. 93, p. 261-268, 2004.

ELIBOL M, OZER D. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochem**, v. 36, p. 219–33, 2000.

ELIBOL M.; OZER D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochem**, v. 38, p. 367–72, 2002.

ERICKSEN, S.S.; SZKLARZ, G.D. **J. Biomol. Struct. Dyn**, v. 23, p. 243–256, 2005.

FABER, K., ed. Em **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**; 3rd ed.; Springer Produktions-Gesellschaft: Berlin, cap. 2, 1997.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G.; Modificação por via enzimática da composição triglicérida do óleo de piqui. **Quim. Nova**, v. 21, p. 16, 1998.

FERRATO, F; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzimol.**, v. 284, part B, p. 327-347, 1997.

GANGWANG, Z.; SHUWAN, L.; MEI LIU, Z.; HUANG, X.J.; XU.; Z.K.. Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 189–195, 2009.

GANDHI, N. N.; Application of lipases. **J. Am. Oil Chem. Soc**, v. 74, p. 621, 1997.

GILBERT EJ. *Pseudomonas* lipases: biochemical properties and molecular cloning **Enzyme Microb Technol**, v. 15, p. 634, 1993.

HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*, I. Lipases from yeasts. **Acta Biotechnologica**, v. 11, no. 2, p. 159-167, 1991.

HARALDSSON, G. G.; The applications of lipases for modification of fats and oils, including marine oils. **Marine Lipids Biotechnology**, v. 7, p. 337, 1991.

HARTMEIER, W. Immobilized biocatalysts – an introduction. Trad. J. Wieser, Berlin, Springer-Verlag, 1988.

HERTZBERG, S.; KVITTINGEN, L.; ANTHOSEN, T.; Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. **Enzyme Microb. Technol**, v. 14, p. 42, 1992.

HOLKER U.; HOFER M.; LENZ J. Biotechnological advantages of laboratoryscale solid state fermentation with fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p.175–86, 2004.

HOLWERDA, K.; VERKADE, P.E.; WILLINGEN, A.H.A. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 55, p.43, 1936.

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

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

JANEGITZ, B. C.; MARCOLINO JUNIOR, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica por redissolução anódica de cu(ii) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1673-1676, 2007.

JEGANNATHAN K.R.; ABANG S.; PONCELET D.; CHAN E.S.; RAVINDRA P. Production of biodiesel using immobilized lipase — a critical review. **Crit Rev Biotechnol** v. 28, p. 253–64, 2008.

JENSEN, R. G.; GALLUZZO, D. R.; BUSH, V. J. Selectivity is an important characteristic of lipases (acylglycerol hydrolases) **Biocatalysis**, v. 3, p. 307, 1990.

JU, K.S.; PARALES, R.E. Control of substrate specificity by active-site residues in nitrobenzene dioxygenase. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 72, p. 1817–1824, 2006.

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

KARAM, J.; NICELL, J. A.; Potential applications of enzymes in waste treatment. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v. 69, p. 141, 1997.

KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Em **A Multi-Volume Comprehensive Treatise Biotechnology**. Rehm, H. J.; Stader, P., eds. v. 8A, p. 38, 1998.

KAWAGUTI, H. Y. & SATO, H. H.. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Quim. Nova**, v. 31, p. 134-143, 2008.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. "Immobilized enzymes". In: Solid phase biochemistry – analytical and synthetic aspects. New York. John Wiley & Sons, 1975.

KJALID, M. N.; HO, L.; AGNELY, J.L.; GROSSIORD, J.L.; COUARRAZE, G. Swelling properties and mechanical characterization of a semi-interpenetrating chitosan/polyethylene oxide network. Comparison with a chitosan reference gel, **STP Pharm. Sci**. v. 9, p. 359–364, 1999.

KHUMALO, L. W.; MAJOLO, L.; READ, J. S.; NCUBE, I.; Characterisation of some underutilised vegetable oils and their evaluation as starting materials for lipase-catalysed production of cocoa butter equivalents. **Ind. Crops Products** v. 16, p. 237, 2002.

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

KIERSTAN, M. P. J.; COUGHLAN, M. P. Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment. In: Woodward J (ed) Immobilized cells and enzymes: a practical approach. IRL Press, Oxford, p. 39–48, 1985.

KLIBANOV, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends Biotechnol**, v.15, p. 97–101, 1997.

KNAPP J. S. & HOWELL, J. A. Solid substrate fermentation. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnol**, v. 4, p. 85-143, 1977.

LATHA, K.; RAMARETHINAM, S. Studies on lipid acyl hydrolases during tea processing. **Ann Plant Physiol**, v. 3, p. 73–8, 1999.

LEAL, M. C. M. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA Jr., G. L.; Effect of enzymatic hydrolysis on aerobic treatment of dairy wastewater. **Braz. J. Chem. Eng**, v. 19, p. 175, 2002.

LEUNG, D. Y. C.; WU, X.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, v. 87, p. 1083–1095, 2010.

LIE, E.; MOLIN, G. Em Bioconversion of waste materials to industrial products. Martin, A. M., ed.; **Elsevier Applied Science**: New York, p. 401, 1991.

LONSANE B.K.; SAUCEDO-CASTANEDA G.; RAIMBAULT M.; ROUSSOS S.; VINIEGRA- GONZALEZ G.; GHILDYAL N.P.; RAMAKRISHNA M.; KRISHNAIAH M.M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochem**, v. 27, p. 259–73, 1992.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C.; Present and future applications of lipases. **Biotechnol. Genetic Eng. Rev**, v. 3, p. 193, 1985.

MAUGARD, T.; REJASSE, B.; LEGOY, M. D. Synthesis of water-soluble retinol derivatives by enzymatic method. **Biotechnol Prog**, v. 18, p. 424–8, 2002.

MASSE, L.; KENNEDY, K. J.; CHOU, S.; Testing of alkaline and enzymatic pretreatment for fat particles in slaughterhouses wastewater. **Bioresour. Technol**, v.77, p. 145, 2001.

MESSING, R. A. Immobilized enzymes for industrial reactors. New York, Academic Press, 1975.

MITCHELL, D.A.; DO, D. D.; GREENFIELD, P. F.; DOELLE, H. W. A semi-mechanistic mathematical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. **Biotechnol Bioeng**, v. 38, p. 353-362, 1991.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. In: Sheper T (ed) **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 68, p. 61-138, 2000.

MITCHELL, D. A.; RODRIGUEZ, J. A.; CARRIÈRE, F.; KRIEGER, N. Determination of the quantitative stereoselectivity fingerprint of lipases during hydrolysis of a prochiral triacylglycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 135, p. 168-173, 2008.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system, **Int. J. Biol. Macromol**, v. 26, p. 119–128, 1999.

MURALIDHAR, R.V.; CHIRUMAMILLA, R.R.; MARCHANT, R.; RAMACHANDRAN, V.N.; WARD, O.P.; NIGAM, P. Understanding lipase stereoselectivity. **World J. Microbiol. Biotechnol**, v. 18, p. 81-97, 2002.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida*, *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 11, p. 669–77, 1995a.

PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323: partial purification, characterization and interesterification of butter fat. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 43, p. 42–51, 1995b.

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

PANDEY A. Solid state fermentation. **Biochem Eng J**, v. 13, p. 81–4, 2003.

PATEL, V.R.; AMIJI, M.M. Preparation and characterization of freeze-dried chitosan-poly(ethylene oxide) hydrogels for site-specific antibiotic delivery in the stomach. **Pharm. Res**, v. 13, p. 588–593, 1996.

PEREIRA, R. S.; Projeto e construção de um bioreator para síntese orgânica assimétrica catalisada por *saccharomyces cerevisiae* (fermento biológico de padaria). **Quim. Nova**, v. 5, p. 452, 1995.

PETERSEN, S. B. Em **Engineering of with lipases**; Malcata, F. X., ed.; Kluwer Academic Publishers: The Netherlands, p. 125, 1996.

POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA B.W. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. **J. Mol. Biol**, v. 309, p. 215 – 226, 2001.

RANGANATHAN S. V.; SRINIVASAN LN; MUTHUKUMAR K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresour Technol**, v. 99, p. 3975–81, 2008.

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

RAUNKJAER, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; NIELSEN, P. H.; Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. **Water Res**, v. 8, p. 251, 1994.

REIS, P; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M.E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Scienc**, v. 147–148, p. 237–250, 2009.

ROBERTS G. A. F. Chitin chemistry. London, UK: MacMillan; 1992.

ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Immobilized enzymes and cells. Bristol, Adam Hilger, 1987.

RUBIN, B.; DENNIS, E. A., editors. Lipases: Part B. Enzyme characterization and utilization. **Methods in enzymology**, v. 286, p. 1–563, 1997b.

SARDA, L. & DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les ésters en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 30, p. 513 – 521, 1958.

SCHUCHARDT, U.; SERCHEL, R.; VARGAS, R. M.; Tansterification of Vegetable Oils: a Review **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 9, p. 199, 1998.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. **Methods Enzymol**, v. 284, p. 85 – 107, 1997.

SCHØNHEYDER, F.; VOLQVARTZ, K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. **Acta Physiol. Scand**, v. 9, p. 57-67, 1945.

SEEGER, M.; ZIELINSKI, M.; TIMMIS, K. N.; HOFER, B. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph-encoded catabolic pathway of Burkholderia sp. strain LB400 **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65, p. 3614–3621, 1999.

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

SHANLEY, A.; Enzymes Usher in a New Era **Chem. Eng**, v. 105, 63, 1998.

SI, J. Q.; Synergistic effect of enzymes for bread baking. **Cer. Foods World**, v. 42, p. 802, 1997

SINGHANIA, R. R., PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SMIDSROD, O.; DRAGET, K. I. Chemistry and physical properties of alginates. **Carbohydrates in Europe**, v. 14, p.6-13, 1996.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GÜBITZ, G. M.; STEINER, W.; READ, J.S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **J. of Biotechnol**, v. 75, p. 117-126, 1999.

SVENDSEN, A.; CLAUSEN, I. G.; PATKAR, S. A.; BORCH, K.; THELLERSEN, M.; Protein engineering of microbial lipases of industrial interest. **Method Enzymol**, v. 284, n. 317, 1997.

SZCZESNA ANTCZAK, M.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Review Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, p. 1185–1194, 2009.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 628–634, 2010.

TREVAN M. D. Enzyme immobilization by covalent bonding. **New Protein Techniques. Humana Press**, p. 495–510, 1998a.

TREVAN M. D. Enzyme immobilization by entrapment new protein techniques. **New Protein Techniques. Humana Press**, p. 491–4, 1998b.

- UNDURRAGA, D.; MARKOVITS, A.; ERAZO, S.; Cocoa butter equivalent through enzymatic interesterification of pal oil midfraction. **Process Biochem**, v. 36, p. 933, 2001.
- VAN DER WERF, M.J.; ORRU, R.V.A.; OVERKAMP, K.M.;SWARTS, H.J.; OSPRIAN, I.; STEINREIBER, A.; DE BONT, J.A.M.; FABER, K. Substrate specificity and stereospecificity of limonene-1,2-epoxide hydrolase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14, an enzyme showing sequential and enantioconvergent substrate conversion **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 52, p. 380–385, 1999.
- VARZAKAS T. Rhizopus oligosporus mycelial penetration and enzyme diffusion in soya bean tempe. **Proc Biochem**, v. 33, p. 741-747, 1998.
- VINIEGRA-GONZALEZ G.; FAVELA-TORRES E.; AGUILAR C.N.; ROMERO-GOMEZ S.D.; DIAZ-GODINEZ G.; AUGUR C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochem Eng J**, v.13, p.157–67, 2003.
- VILLENEUVE, P., PINA, M., GRAILLE, J., Determination of pregastric lipase specificity in young ruminants. **Chem. Phys. Lipids**, v. 83, p. 161-168, 1996.
- VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J.; Review: Customizing Lipases For Biocatalysis: A Survey Of Chemical, Physical And Molecular Biological Approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym**, v. 9, p. 113, 2000.
- VITOLO, S. PETRARCA, L.; BRESCI, B. Treatment of olive oil industry wastes. **Biores. Technol**, v. 67, p. 129-137, 1998.
- VULFSON, E. N. Em *Lipases: Their Structure, Biochemistry and Application*; WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B., eds.; Cambridge University Press: Great Britain, p. 271, 1994.
- WANG J.X.; HUANG Q.D.; HUANG F.H.; WANG J.W.; HUANG Q.J. Lipase catalyzed production of biodiesel from high acid value waste oil using ultrasonic assistant. **Chin J Biotechnol**, v. 23, p. 1121–8, 2007.
- WEBER F.J.; OOSTRA J.; TRAMPER J.; RINZEMA A. Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid state bioreactors. **Biotechnol Bioeng**, v. 77, p. 381–93, 2002.
- WILLIS, W. M.; MARAGONI, A. G.; Biotechnological strategies for the modification of food lipids. **Biotechnol. Genetic Eng. Rev**, v. 16, p. 141, 1999.
- WISEMAN A. Introduction to principles. In: Wiseman A, editor. Handbook of enzyme biotechnology. 3rd ed. Padstow, Cornwall, UK: Ellis Horwood Ltd. T.J. Press Ltd.; p. 3–8, 1995.

WOOLLEY, P.; PETERSON, S. B.. Lipases – their structure, biochemistry and applications. **Cambridge Univ. Press**, p. 103-110, 1994.

WOHLFAHRT S, JAEGER KE. Bacterial lipases: biochemistry, molecular genetics and application in biotechnology. **Bioengineering**, v.9, p. 39, 1993.

WOLOSOWSKA, S.; SYNOWIECKI, J. Thermostable β -glucosidase with a broad substrate specificity suitable for processing of lactose-containing products. **Food Chem**, v. 85, p. 181–187, 2004.

YAMADA, K.; CHEN, T.H.; KUMAR, G.; VESNOVSKY, O.; TOPOLESKI, L.D.T.; PAYNE, G. F. Chitosan based water-resistant adhesive. Analogy to mussel glue, **Biomacromol**, v. 1, p. 252–258, 2000.

YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN.; T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, v. 40 p. 2095–2103, 2005.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; Ester synthesis in lipase-catalysed reactions. **Enzyme Microb. Technol**, v. 23, p. 438, 1998.

YAO, K.D.; YIN, Y.J.; XU, M.X.; WANG, Y.F. Investigation of pH sensitive drug delivery system of chitosan/gelatin hybrid polymer network, **Polym. Int**, v. 38, p. 77–82, 1995.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE LIPASE POR PROCESSOS FERMENTATIVOS EM ESTADO SÓLIDO, SUBMERSO E SEMI- SÓLIDO UTILIZANDO O FUNGO

Myceliophthora sp. F 2.1.4

1. Introdução

As lipases, triacilgliceróis hidrolases, fazem parte de um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise de lipídeos. As lipases verdadeiras hidrolisam, total ou parcialmente, o triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres, agindo especificamente na interface água/óleo.

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. Dentre as várias áreas de atuação pode-se destacar a indústria de alimentos, laticíneos, detergentes, farmacêutica, de tratamento de efluentes e de biocombustíveis (HASAN et al., 2009).

Lipases microbianas são biocatalisadores que apresentam estabilidade em solventes orgânicos e regio e enantioseletividade (SNELLMAN et al., 2002); as produzidas por fungos e bactérias, assim como a maioria das outras enzimas industriais, podem ser obtidas por fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FSm).

A FES é caracterizada pelo crescimento dos fungos filamentosos em um substrato sólido na quase ausência de água livre entre as partículas, mas em quantidade suficiente para suportar seu crescimento e metabolismo microbiano (MITCHELL; LONSANE, 1992). A FES geralmente utiliza resíduos agroindustriais como substratos, valorizando esses compostos que seriam acumulados na natureza. Entretanto, o uso da FES é limitado devido à dificuldade do controle de parâmetros como baixa transferência de O₂ e CO₂, bem como remoção de calor e contaminação bacteriana, fatores que impedem o aumento de escala (SURYANARAYAN, 2003).

A FSm consiste de um meio fermentativo líquido, com nutrientes solúveis e é um das metodologias mais usadas para a produção das lipases (ALONSO, 2001). Esse método fermentativo é intrinsecamente mais simples (o calor e a transferência de oxigênio são melhores, e a homogeneidade da cultura é geralmente superior) tornando o processo de fácil monitoramento e de fácil controle de parâmetros operacionais (CASTILHO et al., 2000).

O estudo sobre a maneira como os fungos obtêm seus nutrientes na natureza e quais compostos são essenciais para o desenvolvimento de tecnologias e processor para obtenção de altos rendimentos de bioprodutos (PAPAGIANNI, 2004). Além disso, as

respostas dos microrganismos às variações dos meios de cultura são muito diferenciados e, por isso, há a necessidade de estudar individualmente o meio utilizado para cada cepa que se deseja trabalhar.

Baseado nesses aspectos, o objetivo do presente estudo foi avaliar a produção de lipase por FES em bagaço de cana de açúcar pelo fungo termofílico *Myceliophthora* sp F 2.1.4 e comparar essa produção com a obtida em FSm e com fermentação semi-sólida.

2. Material e métodos

2.1 Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem termofílica *Myceliophthora* sp F 2.1.4 (ZANPHORLIN et al., 2010) pertencente à coleção de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Unesp do Campus de São José do Rio Preto-SP.

2.2 Meios de cultura

Para estocagem e pré-inóculo das linhagens fúngicas foi utilizado um meio nutriente modificado de Fadiloglu et al. (1999) e Castro-Ochoa et al. (2005) (g/L): 1,0 peptona (Himedia); 10 (NH₄)₂SO₄ (Sigma); 10 KH₂PO₄ (Synth); 0,5 MgSO₄·7H₂O (Nuclear); 1,0 CaCl₂ (Nuclear); 25 mL óleo de oliva (Lisboa); 4 mL de Tween 80 (Synth) e 5 mL de solução de elementos traços (22 de Zn SO₄·7H₂O; 11 de H₃BO₃; 5 de MnCl₂·4H₂O; 5 de FeSO₄·7H₂O; 1,6 de CoCl₂·5H₂O; 1,6 de CuSO₄·5H₂O; 1,1 de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O; 50 de EDTA).

2.3 Fermentações

2.3.1 Fermentação em estado sólido (FES)

Para a fermentação em estado sólido foram utilizadas embalagens de polipropileno de 15x30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e de 3 cm de diâmetro, os quais foram então tampados com algodão para permitir a troca de gases. Para essas embalagens foram transferidos 5 g de bagaço de cana de açúcar como suporte para o crescimento fúngico, previamente lavado três vezes com água e seco a 60 °C. Os sacos foram então esterilizados em autoclave durante 20 minutos a 120°C. Um arame revestido em formato espiral foi colocado sobre o material, no interior da embalagem de polipropileno, para evitar a aderência das superfícies.

Nos experimentos iniciais foram utilizados 5,0 g de bagaço de cana de açúcar adicionado de solução nutriente padrão contendo, 20 g/L de peptona, 2,0 g/L de K_2HPO_4 e 0,5 g/L de $MgSO_4$ e 20 g/L de óleo de soja. A partir desse meio, novas condições foram testadas a fim de melhorar a produção da lipase:

a) Tipo de fonte adicional de carbono. As fontes de carbono testadas foram: frutose, glicose, glicerol, lactose, sacarose e xilose, nas concentrações de 5,3 g/100g de meio sólido.

b) Tipo de fonte adicional de nitrogênio. Como fontes de nitrogênio foram utilizados os seguintes compostos: uréia, cloreto de amônia, sulfato de amônia e nitrato de amônio, nas concentrações de 1,6; 2,6 e 3,9 g/100g de meio sólido do elemento N.

c) Quantidade da fonte de carbono adicional: após a escolha da fonte de carbono adicional mais adequada para a produção da enzima, esta foi testada em concentrações de 2,6; 5,2 e 7,8 g/100g.

d) Quantidade da fonte de nitrogênio adicional: após a escolha da fonte de nitrogênio adicional mais adequada para a produção da enzima, esta foi testada em concentrações de 1,3; 2,6 e 3,9 g/100g.

e) Relação C:N: foi testada as fontes de carbono e nitrogênio em proporções de 1:1; 1:2 e 2:1.

f) Indutor da lipase. Para induzir a produção de lipase, alguns óleos foram testados como: óleo de canola, girassol, algodão, soja e azeite a 21,4 g/100g de material sólido;

g) Número de esporos (5×10^5 , 5×10^6 e 5×10^7) totais.

h) Solução de extração da enzima e volume utilizado. Algumas soluções foram testadas para extrair a enzima na FES: água, tampão fosfato 0,05 M pH 7 e soluções de Triton X-100 a 0,1, 0,5 e 1% nos volumes de 40, 50 e 60 mL.

i) O tempo de fermentação: 240 horas com amostragens a cada 24 horas.

As fermentações foram conduzidas em estufa a 45°C por 72 horas em todos os testes, exceto para o teste descrito no item 2.3.1, letra *i*. Para a obtenção da solução enzimática bruta, foram adicionados 50 mL de solução eluidora para suspensão do material fermentado. Para os experimentos mencionados nos itens *a* até *g* foi usado água como eluente. O material fermentador foi deixado em suspensão sob agitação por 30 minutos e, posteriormente, filtrado e centrifugado.

2.3.2 Fermentação Submersa (FSm)

A FSm foi realizada em erlenmeyer de 250 mL, tampados com algodão, contendo 50 mL do meio estéril constituído conforme os resultados obtidos em FES, considerando as melhores fontes de carbono e nitrogênio suplementares. Esse meio foi inoculado com 5×10^6 esporos fúngicos totais e incubado a 45°C sob agitação de 100 rpm por 72 horas. Após período de fermentação, o material em erlenmeyer foi filtrado a vácuo utilizando-se papel de filtro Watman nº 1 e centrifugado. O sobrenadante foi utilizado como solução enzimática bruta extracelular. A massa micelial foi mantida a 60°C até peso seco constante, para avaliação do crescimento microbiano.

2.3.3 Fermentação semi-sólida

A fermentação semi-sólida foi feita em erlenmeyer de 250 mL tampados com algodão contendo 50 mL de solução nutriente estéril considerada a mais adequada para a produção de lipase nos ensaios em FES além de buchas vegetais (*Luffa cylindrica*) previamente lavadas com água quente. As esponjas foram cortadas em tamanhos próximos de 1,5 x 1,5 cm. Após a inoculação fúngica, os frascos foram incubados em shaker com agitação de 100 rpm a 45°C por 48 horas. Após período de fermentação, o material em erlenmeyer foi filtrado a vácuo utilizando-se papel de filtro Watman nº 1 e centrifugado.

2.4 Determinação do número de esporos

Esporos de cultura de 4 dias em meio descrito no item 2.2 a 45°C foram suspensos em 50 mL de água com ajuda de uma alça de inoculação. Uma alíquota dessa suspensão foi então visualizada na câmara de Neubauer para contagem dos esporos.

2.5 Ensaios para determinação da atividade de lipase

2.5.1 Ensaio enzimático para medida de atividade esterase

O ensaio da atividade de hidrólise seguiu o protocolo modificado por Lima et al. (2004). Foi utilizado o substrato sintético específico *p*-nitrofenil palmitato a uma concentração de 3 mg/mL de propanol (solução A). Separadamente, foi feita uma solução contendo tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0, Triton X-100 (2%) e goma

arábica (0,5%) como surfactante (solução B). Essa solução foi aquecida brevemente e, então, a solução A foi adicionada. Os testes foram feitos em tubos de ensaio contendo 900 µL da solução (A + B) + 100 µL de solução enzimática. A reação aconteceu em banhos térmicos a 35° C por 1 minuto. No controle, foram utilizados 900 µL da solução B + 100 µL da solução enzimática. A atividade enzimática foi calculada pela equação:

$$U = \left(\frac{\text{Abs} \times V_t}{\epsilon \times V_e \times T} \right) \times 10^3 \times D$$

Onde:

U= Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL, no qual uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 µmol de *p*-nitrofenil por minuto, sob as condições do ensaio.

Abs = Absorbância da amostra à 410 nm;

Vt = Volume total da reação (mL);

ε = Coeficiente de extinção Molar (L.mol⁻¹.cm⁻¹);

Ve = Volume da Enzima (mL);

T= Tempo de Incubação;

10³ = Fator de correção da unidade de ε

D= Diluição da amostra, se houver.

2.5.2 Ensaio para determinação da atividade hidrolítica usando processo de titulação quantificado pela liberação de ácidos graxos.

A titulação foi utilizada para determinação da atividade hidrolítica utilizando as enzimas provenientes das hifas imobilizadas em buchas vegetais. Em um erlenmayer de 250 mL foram adicionados 90 mg de goma arábica, 3 mL de água, 4 mL de tampão referente ao pH testado, 1 mL de azeite de oliva e aproximadamente 3 pedaços de bucha vegetal que foram previamente pesadas. Essa mistura foi colocada em um shaker a 35°C por 30 minutos com uma agitação de 150 rpm. No controle foi adicionado 1 mL de água ao invés do extrato enzimático.

A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de uma solução (1:1) de acetona e álcool etílico. Foi utilizado o indicador ácido-base fenolftaleína e a titulação foi realizada com a base KOH (0,05M). O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a seguinte equação:

$$U = \frac{(V_{\text{KOH}} - V_{\text{KOH controle}}) \times M_{\text{KOH}} \times 1000}{P_{\text{amostra}} \times \text{tempo}}$$

Onde:

U= Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL, no qual uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto;

V_{KOH} = Volume da base KOH utilizado na titulação (mL);

M_{KOH} = Massa de base KOH utilizado na titulação do controle (M);

P_{amostra} = Peso das buchas vegetais utilizadas (g)

Tempo = Tempo de reação (minutos).

3. Resultados e discussão

3.1 Estudo da produção da enzima por FES

Na Figura 1 são apresentadas as produções de lipase em meio constituído por diferentes fontes de carbono suplementares (foram obtidas soluções enzimáticas utilizando 50 mL de água). Para esse ensaio foram utilizados: (g/100g) 5,3 peptona, 0,53 K_2HPO_4 , 0,13 MgSO_4 , 22,5 óleo de oliva, 66,2 bagaço de cana de açúcar, 5,3 da fonte de carbono testada e 2,6 mL de água/g de material sólido. Como pode ser observado, a adição de fonte de carbono suplementar ao óleo de oliva resultou em aumentos consideráveis na produção da enzima, com exceção da glicose e da xilose. O meio com glicerol e sacarose proporcionaram uma produção de 1,2 e 1,7 U/mL, respectivamente, enquanto que na ausência das fontes de carbono adicionais (somente óleo), o fungo produziu somente 0,1 U/mL de lipase.

Resultados diferentes foram obtidos por Rodriguez et al. (2006) quando estudaram a produção de lipase pelo fungo *Rhizopus homothallicus* em FES modificando as fontes de nutrientes. Esses autores afirmaram que não houve grandes diferenças na produção da enzima em função da fonte de carbono utilizada já que o óleo presente no meio serviu como fonte de carbono para sustentar o crescimento microbiano

e proporcionar a produção da lipase. Entretanto, Lin et al. (2006) testaram diferentes fontes de carbono e observaram que a adição de sacarose ao meio contribuiu para o aumento da produção da lipase de *Antrodia cinnamomea*.

A adição de fonte de carbono suplementar elevou a produção da enzima, possivelmente por promover o maior crescimento fúngico. Entretanto, embora os açúcares como glicose e xilose tenham também favorecido o crescimento do micro-organismo (dados visuais) resultaram em menores produções das enzimas em relação às demais fontes de carbono usadas, provavelmente por exercerem efeito repressor da síntese de lipases.

Lotti et al. (1998) avaliaram o controle de expressão e secreção de lipase de *Candida rugosa* e observaram o efeito repressor da glicose e também descreveram uma produção basal de lipase na ausência de indutor. Foi sugerido que há dois genes que codificam as lipases, os quais sofrem regulações diferentes. Um deles seria expresso de forma constitutiva e o outro por indutores. Dessa forma, podemos inferir que a quantidade de lipase produzida nos testes realizados com glicose e xilose, foram resultado do gene que se expressa de forma constitutiva, sendo a indução reprimida pela presença dos açúcares prontamente assimiláveis como a xilose e glicose.

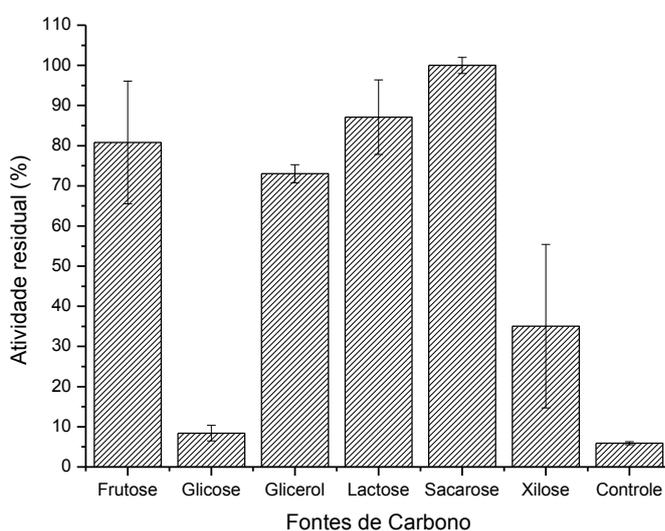


Figura 1: Efeito das fontes de carbono suplementares na produção de lipase em FES pelo fungo *Myceliophthora* sp. F 2.1.4 em meio contendo bagaço de cana de açúcar como suporte e óleo de oliva como indutor, a 45°C, por 72 horas.

Tem sido demonstrado que altas concentrações de nitrogênio assim como o tipo de composto nitrogenado usado levam ao aumento da produção de lipases por micro-

organismos (SUN; XU, 2008). Desse modo, realizou-se ensaios para avaliação dos efeitos de diferentes fontes de nitrogênio suplementares na produção de lipase por *Myceliophthora* sp em meio composto por: (g/100g) 5 peptona, 0,5 K₂HPO₄, 0,12 MgSO₄, 21,4 óleo, 5 sacarose, 62,3 bagaço de cana de açúcar, 5 de fonte de nitrogênio e 2,5 mL de água/g de material sólido. Os dados da Figura 2 mostram que o nitrato de amônio foi o composto que melhor contribuiu para a produção da lipase, atingindo-se uma produção de 4,3 U/mL. Esse resultado confirma a influência do tipo da fonte de nitrogênio na produção da enzima.

Lima et al. (2003) reportaram que a produção de lipase pelo *Penicillium aurantiogriseum* foi estimulada por sulfato de amônio. Outros trabalhos relatam que a peptona é uma importante fonte de nitrogênio suplementar na produção da lipase (SZTAJER; MALISZEWSKA, 1989; FREIRE et al., 1997). Diversos autores como Ginalska et al. (2004) defendem o emprego de nitrogênio orgânico como substrato essencial para uma produção expressiva de lipase. Segundo esses autores, o nitrogênio inorgânico inibiria a produção dessas enzimas. Além disso, Fang; Zhong (2002) sugerem que certos aminoácidos essenciais não conseguem ser sintetizados a partir de fontes de nitrogênio inorgânico.

No entanto, Tan et al. (2003) são discordantes quanto a afirmação de que o nitrogênio orgânico sejam as melhores fontes, já que ele constatou em seus experimentos uma melhor atividade quando empregou o sulfato de amônio, uma fonte inorgânica.

A maior fonte de nitrogênio encontrada na natureza encontra-se na forma de compostos inorgânicos e, desse modo, os organismos podem estar selecionados ao uso desses compostos. É interessante observar que o aumento na produção da enzima com o uso de nitrato de amônio pode ser devido ao fornecimento de duas fontes de nitrogênio possíveis de assimilação pelo fungo, o nitrato e o amônio. Esses resultados sugerem que o *Myceliophthora* é capaz de utilizar essas duas fontes de nitrogênio (MADIGAN et al. 2004).

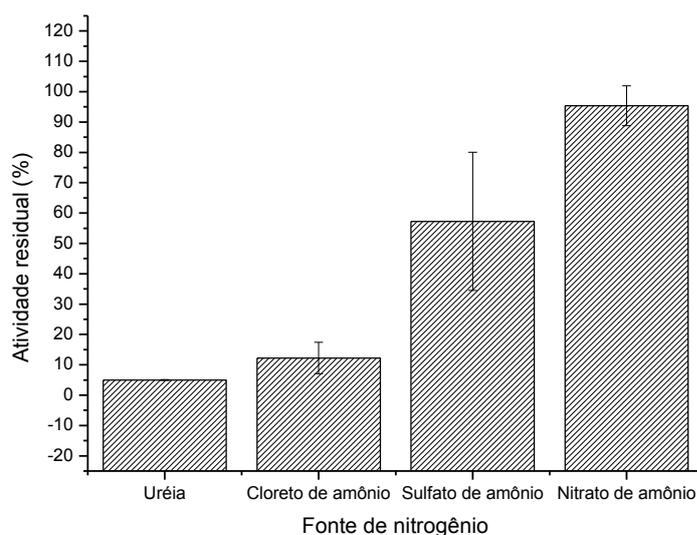


Figura 2: Efeito de fontes de nitrogênio na produção de lipase em FES pelo fungo *Myceliophthora* sp. F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas, utilizando sacarose como fonte de carbono suplementar.

Após a avaliação dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção da lipase, realizou-se experimentos variando as concentrações de sacarose (2,6; 5,2 e 7,8 g/100g) e nitrato de amônio (1,3; 2,6 e 3,9 g/100g). Os dados da Figura 3 mostram que a sacarose deve ser utilizada a 5,2 g/100g para uma maior produção da lipase. A Figura 4 mostra que quando utilizou-se nitrato de amônio, a maior produção da enzima foi obtida quando a concentração desse sal foi de 2,6 g/100g.

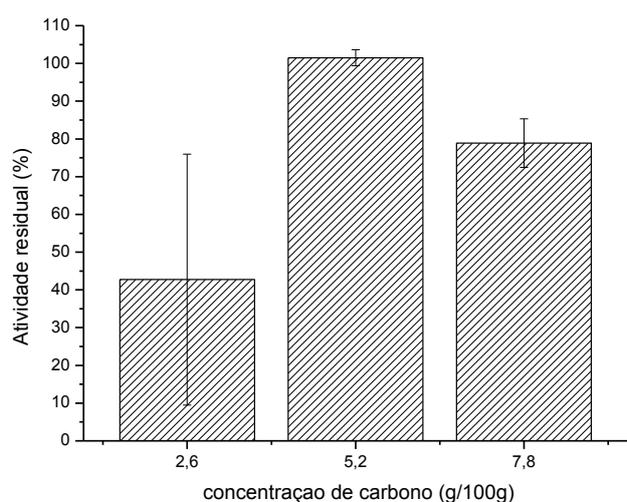


Figura 3: Efeitos da concentração de sacarose na produção de lipase em FES pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4, a 45°C, durante 72 horas.

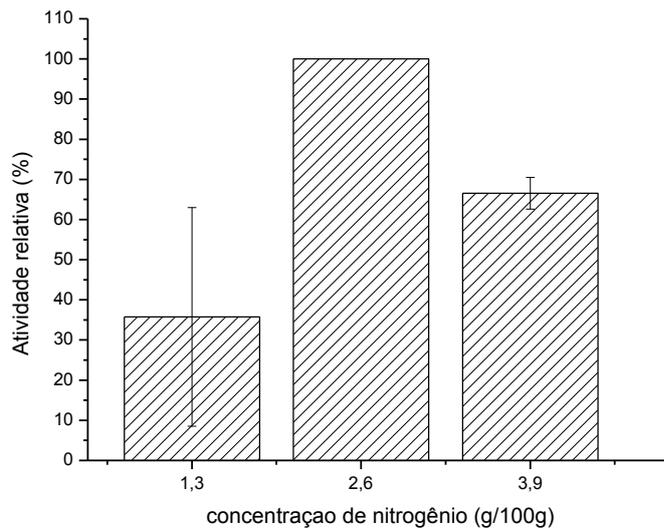


Figura 4: Efeitos da concentração de nitrato de amônio na produção de lipase em FES pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4, a 45 °C, por 72 horas.

Na Figura 5 são mostrados os dados referentes a relação entre concentração de sacarose e nitrato de amônio para a produção da lipase. Pode-se observar que a razão que mais favoreceu a produção da enzima foi a de 1C:2N.

O micélio dos fungos cresce de maneira diferente ao longo de um intervalo da relação C:N, desde que todas as outras exigências nutricionais sejam atendidas. Enquanto as relações menores favorecem uma elevada taxa de proteína micelial, as relações maiores garantem o acúmulo de álcool, acetato derivado de metabólitos secundários, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares (EYAL, 1991). O resultado encontrado, sugere que a menor relação C:N também favoreceu a secreção da lipase.

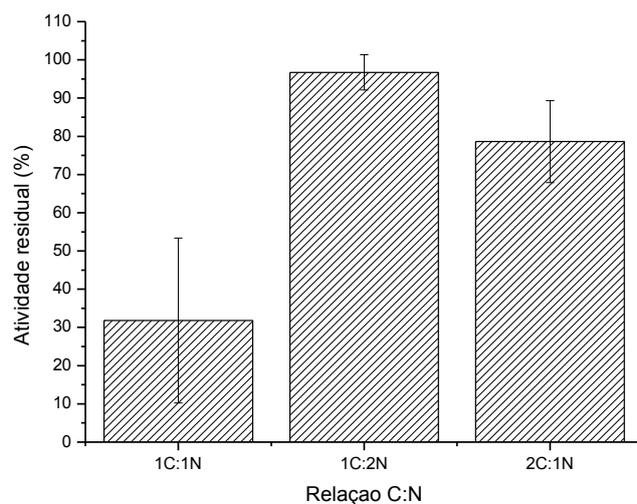


Figura 5: Efeitos da relação Carbono e nitrogênio (C:N) na produção de lipase em FES pelo fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4, a 45°C, por 72 horas.

As lipases são enzimas induzíveis e sendo seus principais indutores, os óleos (RAPP, 1995). Considerando que essas enzimas apresentam enantio- e regio-seletividade, ou seja, podem ser específicas para o tamanho da cadeia do ácido graxo ou pela posição deste na ligação com o glicerol, foram testados diferentes tipos de óleos como possíveis indutores lipase. Apesar da pouca diferença na produção da enzima (Figura 6), o azeite de oliva foi o óleo que proporcionou maior produção, sendo escolhido para o uso como indutor nos ensaios posteriores. Sob o ponto de vista tecnológico, a pouca diferença encontrada entre os indutores para a produção da enzima é um dado animador já que pode permitir o uso de óleos de baixo custo ou de fontes alternativas para a produção da lipase em escala industrial.

Lotti et al. (1998) afirmaram que o ácido oléico é um potencial indutor da lipase. Analisando a Tabela 1, que apresenta as proporções de três ácidos principais que constituem os óleos testados, pode-se observar uma grande quantidade de ácido oléico no azeite. Além de esse ácido servir como um indutor para a produção é também utilizado como fonte de carbono suplementar para o crescimento do micro-organismo (DALMAU et al., 2000; D'ANNIBALE et al., 2006). Montesinos et al. (1996) também mostraram que os ácidos graxos livres, principalmente o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, são indutores da produção de lipase.

Tabela 1: Porcentagem dos ácidos oléico, linoléico e linolênico nos óleos vegetais de diferentes origens (<http://www.campestre.com.br/>)

Óleos	ác. oléico (C18:1) %	ác. linoleico (C18:2) %	ác. linolênico (C18:3) %
Óleo de canola	53 - 70	15 - 30	5 - 13
Óleo de girassol	14 - 35	55 - 75	< 0,3
Óleo de algodão	13 - 44	33 - 59	0,1 - 2,1
Óleo de soja	19 - 30	44 - 62	4 - 11
Óleo de oliva (azeite)	63	15	0,9

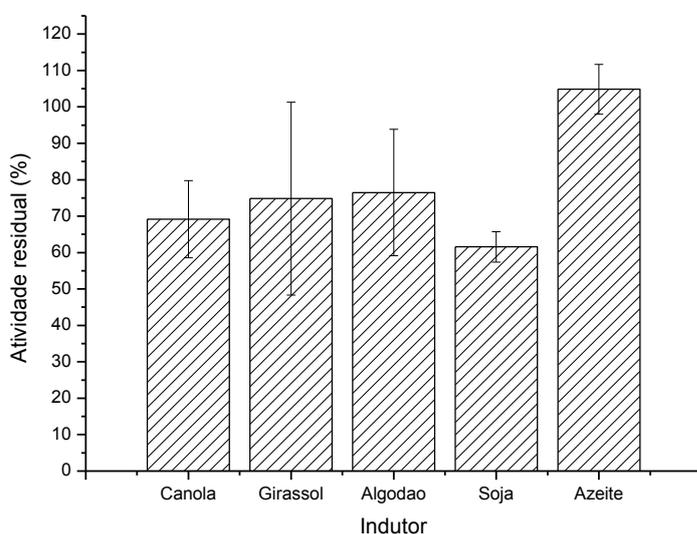


Figura 6: Efeito de diferentes óleos como indutores de lipase na FES pelo fungo *Myceliophthora* sp. no. F 2.1.4., a 45°C, por 72 horas.

A quantidade de inóculo usada para iniciar em processo fermentativo tem sido indicada como fator de influência no desempenho das fermentações. Assim, realizou-se ensaios variando as quantidades de esporos usadas no inóculo. O meio nutriente foi constituído por: (g/100g) 5 peptona, 0,5 K₂HPO₄, 0,12 MgSO₄, 21,4 óleo de oliva, 5 sacarose, 62,3 bagaço de cana de açúcar, 5 de nitrato de amônio e 2,5 mL de água/g de material sólido. A fermentação na qual foi usada 5x10⁶ esporos totais de meio levou a uma maior quantidade de lipase (Figura 7).

A utilização de pouca quantidade de esporos nos processos fermentativos faz com que o crescimento fúngico ocorra de uma forma mais lenta. Por outro lado, o

excesso de esporos inoculados no meio fermentativo diminui o espaço físico necessário para o bom crescimento e, conseqüentemente, para a boa produção enzimática, visto que o estímulo à maior colonização radial do meio permite maior número de terminações de hifas e liberação de vesículas para a secreção das enzimas extracelulares. Muitos estudos afirmam que a secreção das enzimas ocorre na região apical da hifa e, em conseqüência disso, quanto maior o número de terminações de hifas, mais facilmente ocorrerá a secreção das enzimas (ARCHER; PEBERDY, 1997).

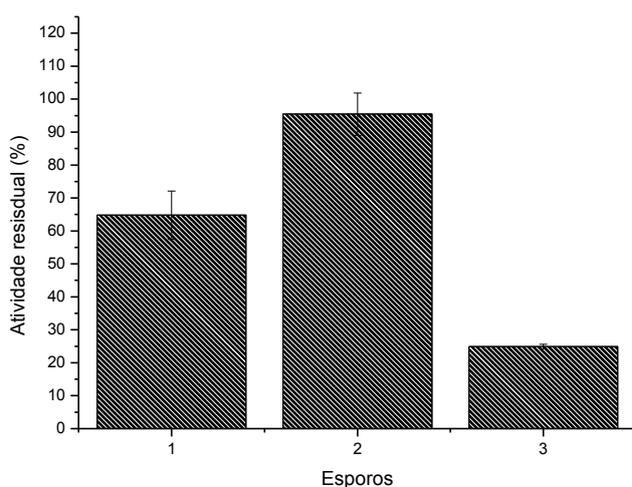


Figura 7: Efeito da quantidade de esporos usados no inóculo na FES para a produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp. 1) 5×10^5 esporos; 2) 5×10^6 esporos e 3) 5×10^7 esporos.

Em FES, as enzimas produzidas podem se manter adsorvidas nas fibras, sendo sua extração dependente do tipo de solução de suspensão usada. Por outro lado, a quantidade dessa solução deve ser suficiente para liberar todas as enzimas, mas não diluir demasiadamente a solução enzimática

Os tipos de eluentes testados influenciaram consideravelmente na quantidade de lipase presente na solução enzimática bruta obtida conforme mostrado na Figura 8. Houve um aumento gradual na atividade da lipase com o uso de água, tampão fosfato 0,05 M pH 7 e as soluções de triton X-100 na ordem de 0,1, 0,5 e 1%. Dessa forma, as soluções de água e de triton X-100 (1%) referem-se ao mínimo e a máxima produção de lipase, respectivamente. Nabarlantz et al. (2010) observaram o mesmo comportamento quando testaram várias soluções de extração para lipases e proteases. Segundo esses autores, essas enzimas são mantidas por interações iônicas e hidrofóbicas na parede celular do micro-organismo ou matrizes presentes no meio. O Triton X-100, sendo

detergente não-iônico, pode auxiliar na liberação dessas enzimas, sendo o agente de solubilização mais usado para permeabilizar células e para extrair e purificar proteínas de membrana isentas de lipídeos (GALABOVA et al., 1996).

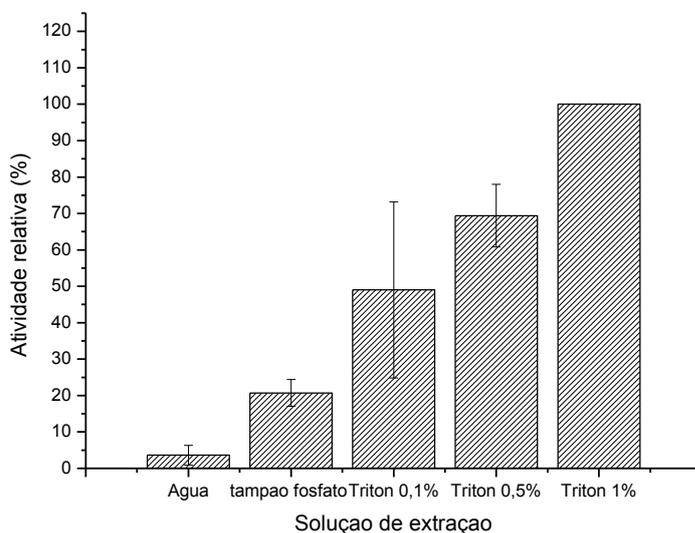


Figura 8: Extração da lipase a partir do material sólido fermentado pelo fungo *Myceliophthora* sp utilizando diferentes eluentes.

Após a definição do meio a ser usado na FES e qual tipo de eluente ser usado para a extração da enzima a partir do material fermentado, as fermentações foram realizadas por períodos de 24 horas até 10 dias para determinar o melhor tempo para a produção da lipase. A Figura 9 permite constatar que o fungo apresentou o seu máximo de produção de lipase entre 120 e 192 horas, atingindo até 21 U/mL. A curva mostra uma queda após esse período o que pode ser ocasionada pela ação de proteases. Zamphorlin et al. (2010) estudaram o mesmo fungo e relataram que o *Myceliophthora* sp F 2.1.4 é um bom produtor de proteases.

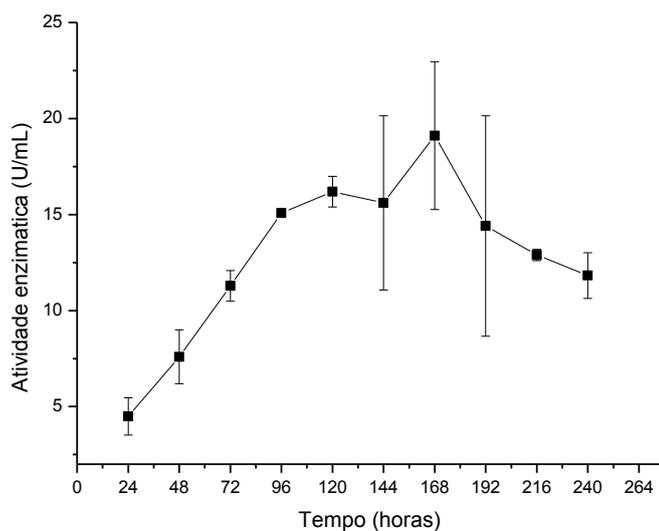


Figura 9: Efeito do tempo de cultivo na produção de lipase pelo fungo *Myceliophthora* sp em FES, utilizando o meio composto por bagaço de cana de açúcar, sacarose, nitrato de amônio e óleo de oliva, a 45°C e extraído-se a enzima com 50 ml de solução de triton X-100 (1%).

3.2 Produção da lipase por Fermentação submersa

A fermentação submersa foi realizada utilizando-se todas as condições consideradas melhores para a produção da enzima em FES, a saber: (g/100g) 5 peptona, 0,5 K₂HPO₄, 0,12 MgSO₄, 21,4 óleo de oliva, 5 sacarose, 62,3 bagaço de cana de açúcar, 5 de nitrato de amônio e 2,5 mL de água/g de material sólido). A Figura 10 mostra a curva de produção de lipase e o crescimento do fungo ao longo do processo fermentativo submerso. É possível observar que as curvas de produção de lipase e de crescimento fúngico estão relacionadas, indicando a secreção da enzima ao longo do crescimento fúngico. Por esse dados pode-se inferir ainda, que a produção da lipase por *Myceliophthora* sp F 2.1.4 em FSm foi acentuadamente menor do que aquela obtida em FES (de 0,20 U/mL contra 21 U/mL obtidas em FES).

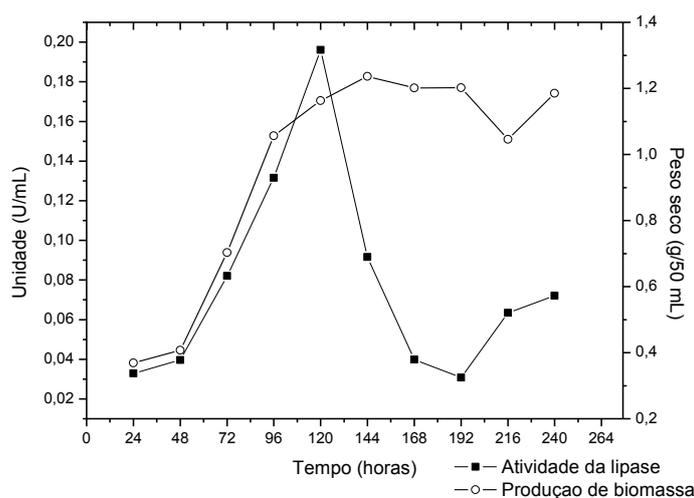


Figura 10: Produção de lipase e biomassa pelo fungo *Myceliophthora* sp nº F 2.1.4 em FSm, a 45°C e 100 rpm.

Baseado nesses resultados, pode-se confirmar a afirmação de Singhanian et al. (2009) de que a FES se assemelha muito ao habitat natural dos micro-organismos e, portanto, é um melhor ambiente para o seu crescimento e para a geração de produtos. Além disso, a utilização de resíduos agrícolas utilizados na FES são cruciais para a viabilidade econômica do processo (SINGHANIAN et al., 2009).

3.3 Produção de lipase por fermentação semi-sólida

Na sequência desses experimentos foi feita a fermentação semi-sólida, ou seja, a fermentação submersa utilizando o meio nutricional constituído por (g/100g) 5 peptona, 0,5 K₂HPO₄, 0,12 MgSO₄, 21,4 óleo de oliva, 5 sacarose, 5 de nitrato de amônio e 2,5 mL de água/g de material sólido e de bucha vegetal para o suporte das hifas. Os resultados são bastante animadores já que o fungo, nessas condições (em 48 horas de fermentação), produziu uma média de 9 U/mL. Essa quantidade é bem superior a encontrada na FSm.

Ao longo do processo fermentativo foi constatada a intensa colonização do suporte (bucha) pelas hifas fúngicas mostrando que o fungo teve um bom desenvolvimento nesse suporte, resultando em considerável produção da lipase.

4. Conclusões

Neste trabalho o estudo de fatores nutricionais em FES evidenciaram como melhor composição o seguinte meio nutricional: (g/100g) 5 peptona, 0,5 K₂HPO₄, 0,12 MgSO₄, 62,3 bagaço de cana de açúcar, 21,4 óleo de oliva, 5,2 sacarose, 2,6 de nitrato de amônio e 2,5 mL de água/g de material sólido, 5x10⁶ esporos para inoculação, sendo a maior extração da enzima obtida com solução de triton X-100 (1%).

As fontes de carbono e nitrogênio suplementares levaram ao aumento da produção da lipase, evidenciando a necessidade desses compostos para o desenvolvimento do micro-organismo utilizado. Entretanto, os açúcares como glicose e xilose reprimiram a produção da lipase.

O fungo *Myceliophthora* sp F 2.1.4 produziu uma quantidade maior de enzimas na presença do nitrato de amônio o que pode ser um indicativo da capacidade desse fungo em utilizar ambos os íons.

O óleo de oliva foi considerado o melhor indutor da lipase possivelmente pela maior quantidade de ácido oléico que tem sido discutido como indutor de lipase.

A quantidade de esporos utilizados nos processos fermentativos interferiu no crescimento do fungo filamentoso e na produção da enzima.

Entre os tipos de fermentação usados, as maiores atividades de lipase foram obtidas nas soluções enzimáticas oriundas de FES e fermentação semi-sólida.

5. Referências Bibliográficas

<http://www.campestre.com.br/> - Visualizado em 01/04/2011

ALONSO, F. O. M. Efeito da agitação e aeração na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ). Centro de ciências da saúde. UFRJ. Rio de Janeiro, 2001.

ARCHER, D. B., & PEBERDY, J. F. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 17, p. 273–306, 1997.

CASTRO-OCHOA, L .D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR 11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-65, 2005.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA, Jr., G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 239 – 247, 2000.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-Mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresouce Technology**, 2006.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J. L.; LOTTI, M.; CASAS, C. Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657 – 663, 2000.

EYAL, J. Mushroom mycelium grown in submerged culture—Potential food applications. In **Biotechnology and Food Ingredients** (I. W. Goldberg, ed.), p. 31–64. Van Nostrand Reinhold, New York, 1991.

FADILOGLU, S.; ERKMEN, O. Lipase production by *Rhizopus oryzae* growing on different carbon and nitrogen sources. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p.1936-1938. 1999.

FANG, Q. H., & ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—Ganoderic acid and polysaccharide. **Biochem. Eng. J**, v. 10, p. 61–65, 2002

FREIRE, D. M. G.; TELES, E. M. F.; BON, E. P. S.; SANT'ANNA, G.L. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter. effect of carbon and nitrogen nutrition agitation and aeration. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 63/64, p. 409–21, 1997.

GALABOVA, D., TULEVA, B. E SPASOVA, D., Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100., **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 18-22, 1996.

GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KORNILLOWICZ-KOWASLKA, T. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 177 – 182, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782 – 798, 2009.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technol Biotechnol**, v. 41, p. 105–10, 2003.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

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

LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J. L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. Physiological control on the expression and secretion of *Candida arugosa* lipase. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 143 – 148, 1998.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. Prentice Hall, 2004.

MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characteristics and potential. In Solid Substrate Cultivation (H. W. Doelle, D. A. Mitchell, and C. E. Rolz, eds.), pp. 1–10. Elsevier, London, 1992.

MONTESINOS, J. L.; OBRADORS, N.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; SOLA, C. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 59, p. 25 – 37, 1996.

NABARLATZ, D.; VONDRYSOVA, J.; JENICEK, P.; STÜBER, F.; FONT, J.; FORTUNY, A.; FABREGAA, A.; BENGGOA, C. Hydrolytic enzymes in activated sludge: Extraction of protease and lipase by stirring and ultrasonication. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 17, p. 923–931, 2010.

NAGY V.; TOKE E. R.; KEONG L. C.; SZATZKER G.; IBRAHIM D.; OMAR I. C.; SZAKACS G.; POPPE L. Kinetic resolutions with novel, highly enantioselective fungal lipases produced by solid-state fermentation. **J Mol Catal B Enzym**, v. 39, p 141–8, 2006.

PANDEY A.; SOCCOL C. R.; MITCHELL D. New developments in solid-state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem**, v. 35 p. 1153–69, 2000.

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

RODRIGUEZ, J. A.; MATEOS, J. C.; NUNGARAY, J.; GONZALEZ, V.; BHAGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2264–2269, 2006.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Review. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13–18, 2009.

SNELLMAN, E. A., SULLIVAN, E. R., & COLWELL, R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 269–274, 2002.

SUN, S. Y.; XU, Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 219–224, 2008.

SURYANARAYAN, S., Current industrial practice in solid state fermentations for secondary metabolite production: the Biocon India experience. **Biochem. Eng. J.**, v. 13, p. 189, 2003.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, J. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotech Lett**, v. 11, p. 895–8, 1989.

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

ZANPHORLIN, L.M.; FACCHINI, F. D. A.; VASCONCELOS, F.; BONUGLI-SANTOS, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Production, partial characterization and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Journal of Microbiology**, v. 48, p. 331 – 336, 2010.

CAPÍTULO 3

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE PRODUZIDA PELO FUNGO

Myceliophthora sp F 2.1.4

1. Introdução

Nos últimos anos, as lipases (triacilgliceróis hidrolases, E.C. 3.1.1.3) serviram como versáteis biocatalisadores capazes de atuar em numerosas reações. Essas enzimas catalisam não só reações de hidrólise, mas também a síntese de compostos (TENG et al., 2009).

As principais aplicações das lipases estão nas indústrias de detergentes e remoção de óleos e gorduras. Entretanto, também têm sido usadas em indústrias de alimentos, tratamento de efluentes, síntese de biosurfactantes, remoção de resinas em processos de papel de polpa celulósica, reações de biotransformação na síntese de drogas e síntese de biodiesel (JAEGER; REETZ, 1998). Neste último caso, a utilização da lipase em reações de transesterificação para produção dos acil-ésteres do biodiesel está se tornando cada vez mais atrativa (RANGANATHAN et al., 2008).

A área da biotecnologia tem mostrado grande interesse para as lipases de origem microbiana, sendo essas as mais estudadas atualmente. Este interesse é devido às características próprias dessas enzimas, como estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial uma vez que permite maior controle de parâmetros (temperatura, pH) e maior eficiência.

As lipases têm sido aplicadas em vários segmentos e, nesse sentido, a caracterização dessas enzimas é essencial para o estabelecimento das condições de trabalho e aplicações já que cada ramo industrial tem suas próprias exigências.

Um dos grandes obstáculos com o uso de processos baseados em enzimas é o alto custo das enzimas. A imobilização de enzimas tem sido usada para obter enzimas reutilizáveis, além de enzimas mais estáveis às diferentes temperaturas (FJERBAEK; CHRISTENSEN, 2009). Lipases têm sido imobilizadas em diferentes suportes de natureza orgânica e inorgânica empregando alguns métodos de imobilização tais como adsorção física, encapsulação ou ligação covalente.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente a lipase produzido pelo fungo *Myceliophthora* sp n^o F 2.1.4 por fermentação em estado sólido e imobilizar a enzima, a partir de dois métodos: imobilização por encapsulação utilizando o polímero alginato e imobilização por ligação covalente utilizando quitosana.

2. Material e métodos

2.1 *Microrganismo, produção e obtenção da enzima*

A lipase foi produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp. F 2.1.4 em fermentação em estado sólido. Foram utilizados 5 g de bagaço de cana de açúcar e 20mL de solução nutriente contendo: (g/L) 20 peptona (Himedia), 2 K₂HPO₄ (Synth), 0,5 MgSO₄ (Nuclear), 20 sacarose (Merck), 20 de nitrato de amônio e 17 de óleo de oliva (Lisboa), a fermentação ocorreu a 45°C, por 168 horas. A extração da enzima a partir do material fermentado foi realizada com solução de 1% de triton X-100, utilizando-se 10 mL de solução/g de material fermentado, agitação de 100 rpm por 30 minutos e centrifugação a 10000 g, a 4°C.

2.2 *Determinação da atividade esterase.*

O ensaio da atividade de hidrólise lipolítica seguiu o protocolo modificado por Lima et al. (2004). Foi utilizado o substrato sintético específico, *p*-nitrofenil palmitato a uma concentração de 3 mg/mL de propanol (solução A). Separadamente, foi feita uma solução contendo tampão fosfato de sódio 0,05M pH 7,0, Triton X-100 (2%) e goma arábica (0,5%) como surfactante (solução B). Essa solução foi aquecida brevemente e, então, a solução A foi adicionada. Os testes foram feitos em tubos de ensaio contendo 900 µL da solução (A + B) + 100 µL de amostra enzimática. A reação aconteceu em banhos térmicos a 35°C por 1 minuto. No controle, foram utilizados 900 µL da solução B + 100µL da solução enzimática.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV visível Cary 100 Varian com comprimento de onda 410 nm. O cálculo da atividade foi feito com o coeficiente de extinção molar do tampão fornecida no artigo acima citado ($\epsilon = 8,03 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, pH 7) e seguiu a seguinte equação.

$$U = \left\{ \left\{ \frac{\text{Abs} \times Vt}{\epsilon \times Ve \times T} \right\} \times 10^3 \right\} \times D$$

Onde:

U= Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL, no qual uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de p-nitrofenil por minuto, sob as condições do ensaio.

Abs= Absorbância da amostra à 410 nm;

Vt= Volume total da reação (mL);

ϵ = Coeficiente de extinção Molar ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$);

Ve= Volume da Enzima (mL);

T= Tempo de Incubação;

10^3 = Fator de correção da unidade de ϵ

D= Diluição da amostra, se houver.

2.3 Ensaio para determinação da atividade hidrolítica usando processo de titulação quantificado pela liberação de ácidos graxos.

A titulação foi utilizada para determinação do pH ótimo, tendo em vista a degradação sofrida pelo substrato sintético *p*-nitrofenil palmitato em pHs altos, interferindo, assim, na veracidade dos resultados. Dessa forma, o seguinte procedimento foi realizado:

Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 90 mg de goma arábica, 3 mL de água, 4 mL de tampão referente ao pH testado, 1 mL de azeite de oliva e 1 mL do extrato enzimático. Essa mistura foi colocada em um shaker a 35°C por 30 minutos com uma agitação de 150 rpm. No controle foi adicionado 1 mL de água ao invés do extrato enzimático.

A reação foi interrompida adicionando-se 10 mL de uma solução (1:1) de acetona e álcool etílico. Foi utilizado o indicador ácido-base fenolftaleína e a titulação foi realizada com a base KOH (0,05M). O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando a seguinte equação:

$$U = \frac{(V_{\text{KOH}} - V_{\text{KOH controle}}) \times M_{\text{KOH}} \times 1000}{V_{\text{amostra}} \times \text{tempo}}$$

Onde:

U= Unidade de atividade enzimática que é expressa em U/mL, no qual uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de ácido graxo por minuto;

V_{KOH} = Volume da base KOH utilizado na titulação (mL);

M_{KOH} = Massa de base KOH utilizado na titulação do controle (M);

V_{amostra} = Volume de amostra enzimático adicionada à reação (mL)

Tempo = Tempo de reação (minutos).

2.4 Determinação do efeito temperatura e pH sobre a atividade da lipase

Para os testes de efeito ao pH foi utilizada a técnica de titulação. A faixa de pH entre 4 e 10 foram testadas, utilizando-se os seguintes tampões: pH 4 e 5 (acetato de sódio - NaOH 30mM), pH 6 (citrato de sódio - NaOH 30mM), pH 7 (hepes 30mM), pH 8 (Tris-HCl 30mM), pH 9 e 10 (glicina 30mM).

Para a determinação da temperatura de atividade máxima, os ensaios de hidrólise foram feitos utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil palmitato. Os testes foram realizados na faixa de temperatura compreendida entre 30 e 60°C.

2.5 Determinação da estabilidade enzimática frente as variações de temperatura e pH.

A estabilidade da enzima frente a diferentes temperaturas e valores de pH foi determinada, utilizando-se o substrato *p*-nitrofenil palmitato.

Os tampões citados no item 2.4 foram utilizados. A solução enzimática bruta foi diluída 20 vezes nos diferentes tampões e mantidas a 25°C. Amostras foram retiradas após os seguintes tempos de exposição: 0, 1, 3, 6 e 24 horas. Em seguida foram realizados os ensaios de hidrólise para determinação da atividade enzimática no pH e temperatura definidos como os melhores para a atividade enzimática.

A estabilidade da enzima em temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60°C foi avaliada encubando-se a solução enzimática bruta por períodos de 0, 1, 3, 6 e 24 horas em cada temperatura. Após cada período, foram feitos os ensaios de hidrólise para determinar a atividade da enzima. Esse procedimento foi realizado para a enzima na sua forma livre e imobilizada em alginato de cálcio e em quitosana.

2.6 Efeito da exposição a diferentes compostos sobre a atividade lipásica

A lipase ficou exposta por 30 minutos a compostos como β -mercaptoetanol, DTT, SDS, Triton X-100 e Tween-80; a alguns íons na forma de cloretos: CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , MnCl_2 , AlCl_2 , AlCl_3 , NaCl , HgCl_2 ; e aos solventes orgânicos: acetona, metanol, etanol, isopropanol, DMSO e acetonitrila. Posteriormente, foi feita a atividade hidrolítica utilizando o substrato *p*-nitrofenil palmitato como substrato, nas condições de pH e temperatura definidos como melhores para a atividade da lipase.

2.7 Especificidade da lipase por substratos sintéticos e naturais

Para a determinação do melhor substrato sintético para a lipase em estudo, seguimos o protocolo citado no item 2.2 para o uso com o substrato *p*-nitrofenil palmitato utilizando-se os substratos *p*-nitrofenil acetato (C2), *p*-nitrofenil-butirato (C4), *p*-nitrofenil miristato (C14), *p*-nitrofenil palmitato (C16) e *p*-nitrofenil estearato (C18). Da mesma forma, foram realizados testes para avaliação da capacidade da enzima em liberar ácidos graxos dos óleos canola, algodão, soja, oliva, palma e girassol. Para esses ensaios usou-se o método titulométrico.

2.8 Imobilização da lipase em polímero alginato

As esferas de alginato de cálcio foram preparadas segundo Betigeri et al. (2002), com diferentes porcentagens de alginato de sódio (2, 2,5, 3 e 3,5 %) e concentrações de CaCl_2 (0,025, 0,05, 0,1 e 0,2M). As soluções de alginato, CaCl_2 e o extrato enzimático foram preparadas em tampão fosfato 0,05M pH 7. Uma mistura do polímero e do extrato foi feita e, depois, a solução final foi gotejada em uma solução de CaCl_2 utilizando-se uma micro-seringa (Figura 1). Depois de formadas as esferas, estas foram lavadas duas vezes com água destilada para a eliminação das enzimas não imobilizadas.

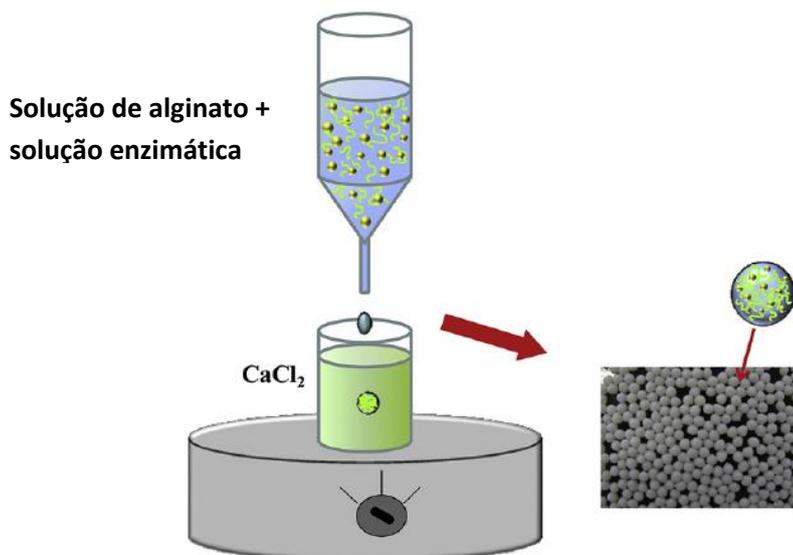


Figura 1: Esquema do processo de imobilização da lipase em alginato de cálcio (LI et al., 2011).

2.9 Imobilização da lipase em quitosana

A quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1% e em seguida foi precipitada em uma solução de NaOH 1M. Com auxílio de uma seringa, a solução do meio ácido foi gotejada na solução alcalina e mantida sob agitação suave por 24 horas (CHIOU; WU, 2004). As microesferas gelificadas foram lavadas com água destilada e submetidas à ativação com uma solução de 1% de glutaraldeído (ADRIANO et al, 2008).

Depois de ativadas, as esferas foram lavadas com água ultrapura e adicionadas à solução enzimática. Nessa etapa, com duração de 3 horas a 4°C, ocorre a ligação da enzima com as esferas. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada para retirada da enzima não imobilizada.

3. Cálculo do rendimento da imobilização

O cálculo do rendimento da imobilização foi realizado seguindo a equação:

$$\text{Rendimento da imobilização (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Onde A se refere a atividade da enzima que foi utilizada para imobilização; B é a atividade da enzima que não foi imobilizada; A - B é a atividade da enzima teoricamente imobilizada (ROMDHANE et al., 2011).

3. Resultados e discussão

3.1 Efeito da temperatura e pH sobre a atividade da lipase

O comportamento da lipase de *Myceliophthora* sp frente a diferentes valores de temperaturas e pHs foi avaliado. A figura 1.a mostra que a maior atividade da enzima ocorreu na faixa de pH entre 5,0 e 7,0. Os dados da literatura tem indicado pH neutro como ótimo para a atividade de lipase de diferentes micro-organismos (FREIRE et al., 1997; KAMINI; MALA, 1998; BENJAMIN; PANDEY, 2000; BURKERT, 2002; TAN et al., 2003; DIAZ ET al., 2006; YU et al., 2007).

A Figura 1.b mostra a atividade da lipase quando incubada em diferentes temperaturas, e pode-se observar que 35°C foi a temperatura em que a enzima apresentou sua melhor atividade hidrolítica. Esse resultado é bastante interessante já que o fungo produtor da lipase é um micro-organismo termofílico e, dessa forma, esperava-se que suas enzimas possuísem temperaturas ótimas mais altas do que a apresentada. Resultados semelhantes são encontrados na literatura para micro-organismos mesofílicos. Hiol e colaboradores (1999) estudaram a lipase produzida pelo fungo mesofílico *Rhizopus oryzae* e observaram a mesma temperatura como a melhor para a atividade da lipase. Da mesma forma, Supakdamrongkul et al., (2010) concluíram como 35°C a temperatura ótima para a lipase de *Spodoptera litura*.

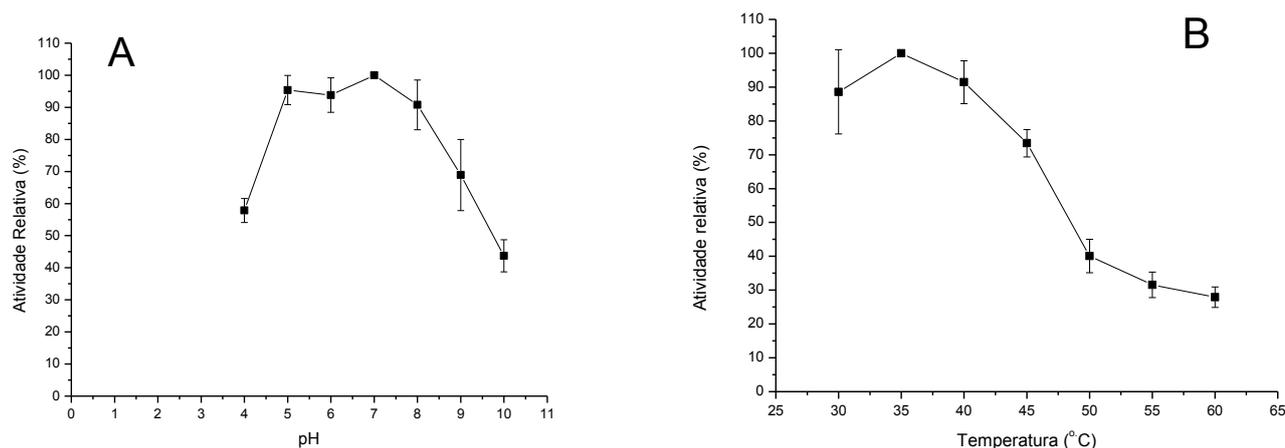


Figura 1: Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp. utilizando-se os métodos titulométrico (A) e colorimétrico (B).

A estabilidade da atividade enzimática do extrato de *Myceliophthora sp* F 2.1.4 em diferentes valores de temperatura e pH também foi investigada. Quanto à temperatura, observou-se que a lipase manteve mais de 90% da sua atividade inicial após 1 hora de exposição a temperaturas de 35 a 50 °C e, mesmo após 24 horas de exposição, a enzima manteve mais de 60% de sua atividade inicial. Nas temperaturas de 55 e 60 °C, a enzima manteve mais de 50% da sua atividade após 1 hora de exposição (Figura 2).

A estabilidade da atividade em diferentes valores de pH pode ser observada na Figura 3. A enzima permaneceu estável em valores de pH entre 5 e 9 por períodos de até 24 horas. Da mesma forma, observa-se uma ativação da enzima nesses pHs. Esse comportamento tem sido relatado para outras lipases também, entretanto, nenhum mecanismo foi proposto para tal fenômeno (LIMA et al., 2004). Nos pHs extremos (4 e 10), houve uma queda da atividade principalmente em pH 10 diminuindo em 70% a sua atividade inicial entre 3 e 5 horas de exposição.

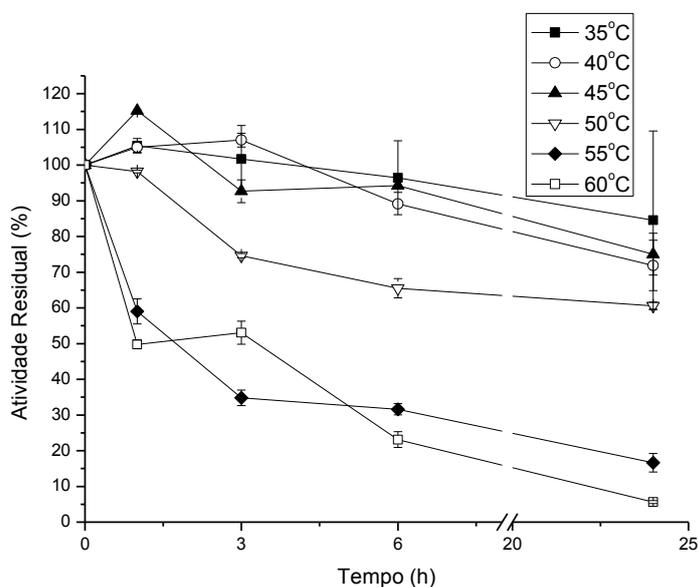


Figura 2: Estabilidade térmica da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora sp*.

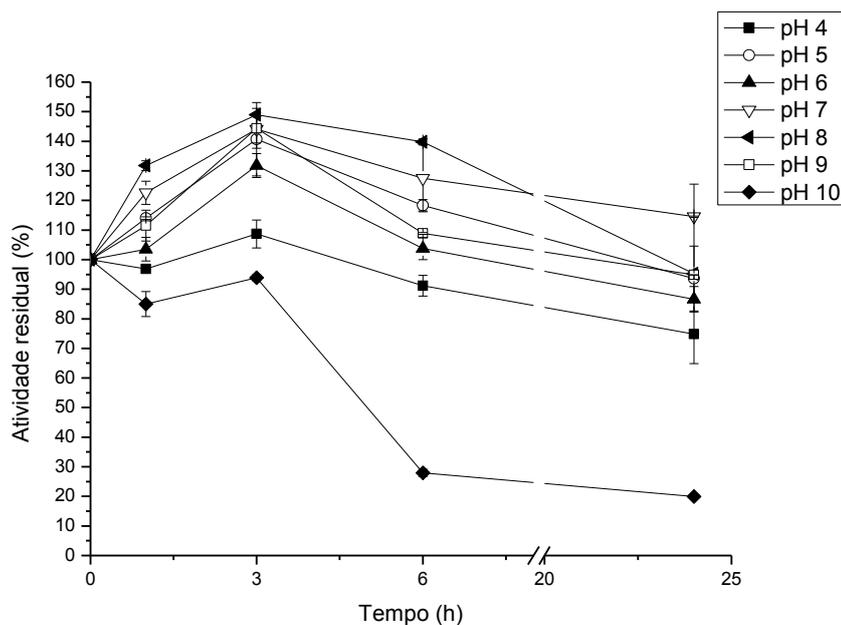


Figura 3: Efeito da variação do pH do meio sobre a atividade da lipase produzida por *Myceliophthora* sp.

3.2 Efeitos de diferentes compostos químicos sobre a atividade da lipase

A Tabela 1 mostra que os compostos β -mercaptoetanol, DTT e Triton X-100 não interferiram ou interferiram pouco na atividade da enzima. Por outro lado, o detergente Tween-80 levou a perda de quase 50% da atividade da enzima e o SDS foi o composto que mais inibiu a ação hidrolítica da lipase, levando a perda de 91% da atividade inicial. Ramani et al. (2010) encontraram resultados similares para a lipase de *Pseudomonas gessardii* que teve sua atividade inalterada na presença de Triton X-100 e mercaptoetanol enquanto que com Tween 80 e SDS a atividade da enzima foi bastante inibida. É possível encontrar muitos estudos que mostram a inibição do SDS na atividade das lipases, dentre eles, Yu e colaboradores (2007), já que esse agente desnatura a estrutura terciária das enzimas, inativando-as.

Dado que merece destaque refere-se a não inibição da enzima. O β -mercaptoetanol tem sido descrito como potente oxidante de grupos SH e cuja ação inibe a atividade de enzimas que possuem resíduos de cisteína em seu sítio ativo e/ou moléculas cuja estrutura depende muito de pontes dissulfeto (SINGH; BANERJEE, 2007). Os dados aqui obtidos sugerem que a lipase de *Myceliophthora* não possui

cisteína no sítio ativo e não requer muitas pontes de sulfeto para estabilização da sua estrutura secundária.

Tabela 1: Comportamento da lipase frente a diferentes compostos

Compostos (10mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
β -mercaptoetanol	92,4 \pm 1,6
DTT	93,2 \pm 1,3
SDS	9,4 \pm 0,1
Triton X-100	99,3 \pm 3,7
Tween - 80	53,5 \pm 3,7

A partir dos dados mostrados na tabela 2, observa-se que os cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} não exerceram efeitos sobre a atividade da enzima. Apesar de o íon cálcio ser um possível ativador das lipases (SNELLMAN et al., 2002), neste trabalho não foi observada essa relação. Este mesmo resultado foi obtido por Côté e Shareck (2008) para a lipase de *Streptomyces coelicolor* A3. Por outro lado, os íons K^+ , Mn^{2+} e Na^+ tiveram um efeito ligeiramente negativo na atividade e o Al^{3+} e o Hg^{2+} foram, dentre os íons testados, os que mais interferiram na atividade da enzima. Cabe destacar que o íon Hg^{2+} exerce efeito inibitório sobre as enzimas por meio de oxidação de grupos SH, quebrando pontes dissulfeto e alterando a estrutura das enzimas (LIU et al., 2008). Nos resultados apresentados, apenas 47% da atividade da enzima foi perdida em presença de Hg^{2+} sugerindo que esta molécula possui poucas pontes dissulfeto na preservação de sua estrutura e não possui aminoácidos sulfonados em seu sítio ativo. Esses dados concordam com aqueles obtidos com mercaptoetanol.

Tem sido discutido que lipases da família I e sub-famílias I.1 e I.2 apresentam dois resíduos de cisteína, que estão envolvidos com as pontes dissulfeto, responsáveis pela estabilização do sítio ativo da enzimas (ARPIGNY; JAEGER, 1999). Provavelmente, a enzima em questão não pertence a esse grupo.

Tabela 2: Atividade da lipase quando exposta a diferentes íons

Íons (10mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100 ± 0,03
CaCl ₂	101,2 ± 4,5
MgCl ₂	99,2 ± 3,3
KCl	75,6 ± 0,7
MnCl ₂	77,8 ± 1,1
AlCl ₃	40,8 ± 0,3
NaCl	76,6 ± 2,9
HgCl ₂	53,4 ± 0,05

A estabilidade da enzima em presença de solventes orgânicos é uma importante característica das lipases, podendo determinar o uso da enzima como catalisador em reações de síntese, além de mostrar quais solventes podem ser utilizados nos meios de reação. Entretanto, a lipase estudada apresenta pouca estabilidade frente a esses solventes em relação às soluções aquosas, como pode ser observado na Tabela 3. Apesar disso, pode ser destacado o comportamento da lipase quando em contato com os solventes metanol e etanol em que foi observado mais de 85 e 72 % da atividade inicial, respectivamente, em solução com 10% de solvente. Esse dado é importante já que a lipase tem sido muito estudada com o intuito de atuar na produção de biodiesel sendo assim necessária uma boa estabilidade diante desses solventes.

Além disso, a Tabela 3 mostra que a lipase estudada é mais estável no isopropanol em comparação com os outros solventes testados. Esse fato também foi encontrado por Demir; Tukul (2010) quando estudaram a lipase de *Spirulina platensis*, em que a lipase manteve 89% da sua atividade relativa na presença de 20% de isopropanol.

Tabela 3: Comportamento da lipase em diferentes solventes orgânicos

Solventes orgânicos	Concentração (%)	Atividade relativa (%)
Controle		100
Acetona	10	54,3 ± 0,1
	20	55,0 ± 0,9
	30	49,0 ± 3,8
Metanol	10	86,8 ± 2,5
	20	60,2 ± 0,7
	30	68,8 ± 2,4
Etanol	10	72,7 ± 2,9
	20	68,6 ± 2,9
	30	62,7 ± 1,2
Isopropanol	10	82,6 ± 1,0
	20	78,4 ± 1,0
	30	63,3 ± 2,6
DMSO	10	70,1 ± 2,1
	20	72,9 ± 2,6
	30	65,7 ± 4,1
Acetonitrila	10	68,3 ± 2,0
	20	50,6 ± 0,5
	30	38,9 ± 4,1

3.3 Especificidade por substratos sintéticos e naturais

A Tabela 4 mostra a atuação da enzima sobre óleos de diferentes origens, sendo observado maiores atividades sobre óleos de algodão e de palma. Entretanto, os resultados mostram a capacidade da enzima em atuar em todos os óleos testados, o que sugere o alto potencial de aplicação dessa enzima na digestão de lipídeos. Da mesma forma, segundo Liu e colaboradores (2008) as lipases com ampla atividade hidrolítica podem atuar em potenciais aplicações na degradação e na reutilização de resíduos de óleo para a produção de biodiesel.

Os óleos são triglicerídeos com ácidos graxos de 18 carbonos e com grau de insaturação diferente, o que atua diretamente na estrutura da molécula, diferenciando-as. Entretanto, não se observou correlação entre a preferência de atividade enzimática em relação à presença de ácido oléico ou linoléico no triacilglicerídeo, nem em relação ao número de insaturações da cadeia. A única correlação possível é que as menores

atividades foram observadas sobre os óleos com maiores proporções de ácido linolênico (óleo de soja e canola).

No presente experimento é difícil inferir constatações sobre a especificidade da enzima visto que os ensaios foram realizados com solução enzimática bruta, da qual não se sabe se existia um tipo ou mais de lipases. A purificação da enzima em continuidade a esse trabalho fornecerá essa informação.

Tabela 4: Atividade da lipase sobre diferentes tipos de óleos bem como a porcentagem dos principais ácidos nos óleos testados.

Substrato	Atividade específica (U/mg)	Atividade Relativa (%)	Ác. oléico (%) C18:1	Ác. linolênico (%) C18:2	Ác. linolênico (%) C18:3
Canola	1,7 ± 0,5	56,9	53 - 70	15 - 30	5 - 13
Algodão	3,1 ± 1,0	100	13 - 44	33 - 59	0,1 - 2,1
Soja	1,8 ± 0,5	56,9	19 - 30	44 - 62	4 - 11
Oliva	2,2 ± 0,4	70,7	63	15	0,9
Palma	2,9 ± 0,1	95,3	36 - 47	6,5 - 15	< 0,5
Girassol	2,5 ± 0,2	81,5	14 - 35	55 - 75	< 0,3

* atividade determinada por método titulométrico

A enzima apresentou atividade crescente sobre ésteres de *p*-nitrofenol de acordo com o aumento da cadeia acila, entretanto, uma queda da atividade foi observada para o substrato *p*-nitrofenil estearato (Tabela 5). Apesar disso, pode-se afirmar que a enzima estudada é uma lipase verdadeira já que apresentou melhor atividade em substratos com cadeia acila superior a 10 carbonos. Enzimas com atividade hidrolítica somente sobre substratos com cadeias menores são classificadas como esterases. Esse conceito sobre a diferença entre lipases e esterases foi definido por Jaeger et al., 1994; Egloff et al., 1995; Ferrato et al., 1997; Verger, 1997; Jaeger et al., 1998.

Tabela 5: Especificidade da lipase para substratos sintéticos

Substrato	Atividade específica (U/mL)	Atividade Relativa (%)
<i>p</i> -Nitrofenil acetato (C2)	2,4 ± 0,1	13,9
<i>p</i> -Nitrofenil butirato (C4)	7,9 ± 0,3	46,0
<i>p</i> -Nitrofenil miristato (C14)	12,3 ± 0,6	71,6
<i>p</i> -Nitrofenil palmitato (C16)	17,2 ± 0,4	100
<i>p</i> -Nitrofenil estearato (C18)	9,3 ± 0,6	54,2

É importante lembrar que o processo de determinação de atividade hidrolítica foi diferente para os substratos naturais e sintéticos, sendo que para os substratos naturais utilizou-se o método de titulação, enquanto que para os substratos sintéticos foi avaliado pelo método colorimétrico.

3.4 Imobilização da enzima em alginato de cálcio

Diante dos resultados apresentados, a imobilização da lipase teve como objetivo aumentar a estabilidade da enzima frente às diferentes temperaturas e permitir o reuso da enzima. Assim, a lipase em estudo foi imobilizada no polímero alginato utilizando-se diferentes concentrações de alginato e CaCl_2 .

Na adição da solução de alginato em uma solução de CaCl_2 , ocorre uma ligação cruzada ocasionando a precipitação das esferas de alginato de cálcio. Assim, as concentrações de alginato e CaCl_2 são parâmetros importantes para o melhor aprisionamento da enzima. Dessa forma, a combinação que mostrou resultados mais vantajosos foi a imobilização em alginato a 3% utilizando solução de cloreto de cálcio a 0,05M. Nessas condições, a imobilização da lipase em alginato de cálcio teve uma retenção de 93 %. Esse valor expressa a quantidade de enzima que ficou imobilizada nas esferas. As esferas formadas com essas características foram utilizadas para os testes posteriores. A Tabela 6 mostra os valores de retenção obtidos para todas as condições de alginato e de cloreto de cálcio testadas.

Tabela 6: Retenção da lipase com relação às diferentes concentrações de alginato e de cloreto de cálcio testadas.

Valores testados	Retenção da lipase (%)
Alginato (2%)	89
Alginato (2,5%)	89
Alginato (3%)	91
CaCl₂ (0,05 M)	93
CaCl ₂ (0,1 M)	88
CaCl ₂ (0,2 M)	85

A Figura 4 mostra o número de ciclos nos quais foi possível usar a lipase imobilizada e pode-se observar que o uso das esferas por 6 vezes consecutivas ainda permitiu a obtenção de 30% da atividade inicial. Houve uma queda brusca entre o primeiro e o segundo ciclo com perda de 50 % da atividade entre um ensaio e outro. Segundo Tischer e Kasche (1999) a maior vantagem da imobilização de uma enzima está na capacidade de produzir biocatalisadores reutilizáveis. Mondal et al. (2006) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* também em alginato e alcançaram 7 ciclos ocorrendo uma queda brusca a partir do 5º ciclo.

A reutilização de enzimas depende muito do método operacional escolhido. Quando em contato com o suporte, a enzima pode interagir por meio de ligações covalentes ou outra forma de interação que terá total importância para a estabilidade da enzima, e conseqüentemente, para que ela possa ser reutilizada com a menor perda de atividade possível.

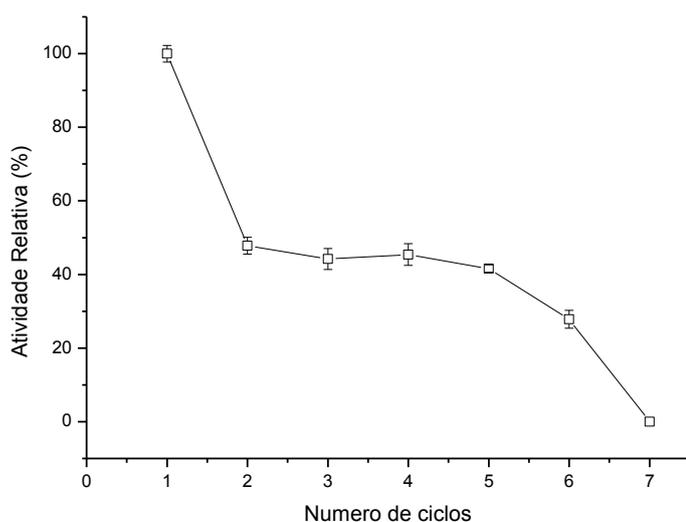


Figura 4: Número de ciclos obtidos com a reutilização da lipase imobilizada em alginato de cálcio

A enzima imobilizada, quando submetida aos testes de estabilidade térmica mostrou considerável aumento na tolerância a temperatura de 50 e 55°C (Figura 5) quando comparada a enzima livre (Figura 2), sugerindo que a técnica de imobilização foi interessante no sentido de preservar a enzima.

Sharma e Gupta (2001) estudaram que o alginato mostra uma afinidade pelas lipases e também pode protegê-las contra a termoinativação. A forte afinidade entre a lipase e o alginato pode causar uma barreira de energia no primeiro passo da desativação, o que resulta em baixas taxas de perda de atividade. Matsumoto e Ohashi (2003) estudaram a termoestabilidade da lipase de *Candida rugosa* comparando a sua forma livre e a immobilizada em alginato e comprovaram um aumento da estabilidade térmica da lipase quando immobilizada.

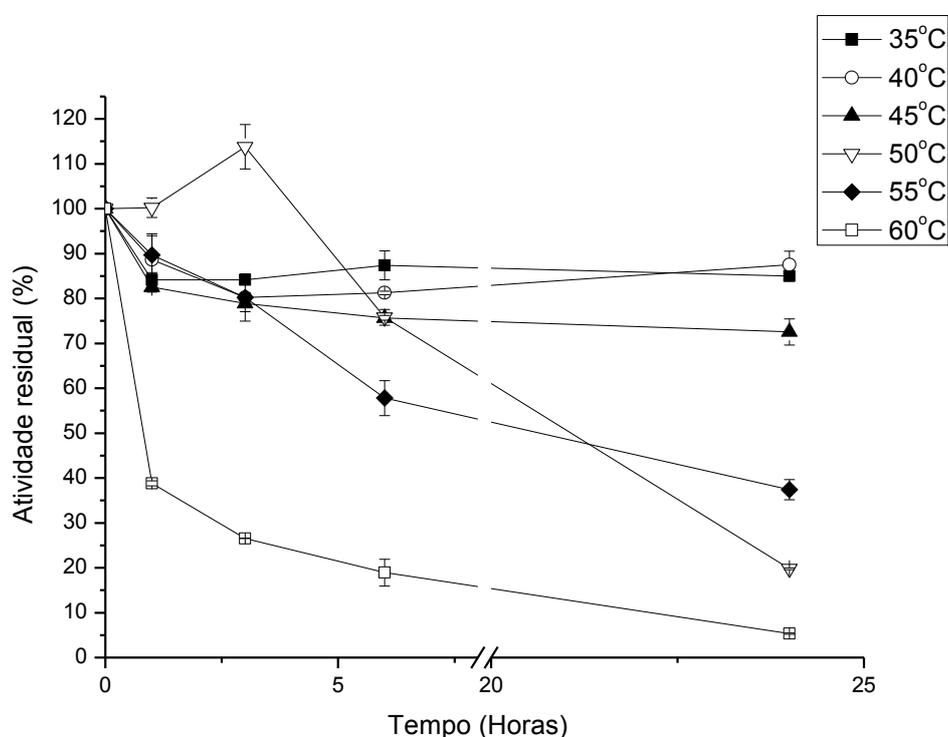


Figura 5: Estabilidade térmica da lipase immobilizada em esferas de alginato de cálcio

Imobilização da lipase em quitosana

Apesar da lipase immobilizada em alginato de cálcio ter mostrado bons resultados, esse método apresenta uma restrição da transferência de massa durante o processo catalítico, assim, a lipase immobilizada por encapsulação só apresenta vantagens para substratos de baixa massa molecular. Baseado nisso, a lipase foi immobilizada utilizando

quitosana, por um método de ligação covalente, ou seja, a enzima não é encapsulada e sim ligada ao suporte. Para esse método, a imobilização teve uma eficiência de 93,4%, bem similar ao outro método de imobilização utilizado.

A Figura 6 mostra os ciclos conseguidos com a lipase imobilizada em quitosana. Pode-se perceber que foi possível uma reutilização de até 12 vezes da enzima, sendo que somente a partir do 9º ciclo a atividade residual foi inferior a 50%. Romdhane et al. (2011) imobilizara a lipase de *Talaromyces thermophilus* em quitosana e reutilizaram repetidamente na hidrólise conseguindo 10 ciclos, todos com mais de 80% de atividade residual. Já Huang et al., (2007) conseguiram reutilizar a lipase 10 vezes com a atividade catalítica diminuindo a cada ciclo, sobrando 46 % no último ciclo.

Uma das desvantagens do método de imobilização por ligação covalente é que a enzima pode se ligar ao suporte de maneira que sua estrutura terciária seja modificada levando-a a inativação. Entretanto, pode-se afirmar que não houve alteração capaz de influenciar negativamente a atividade catalítica tendo em vista os dados apresentados.

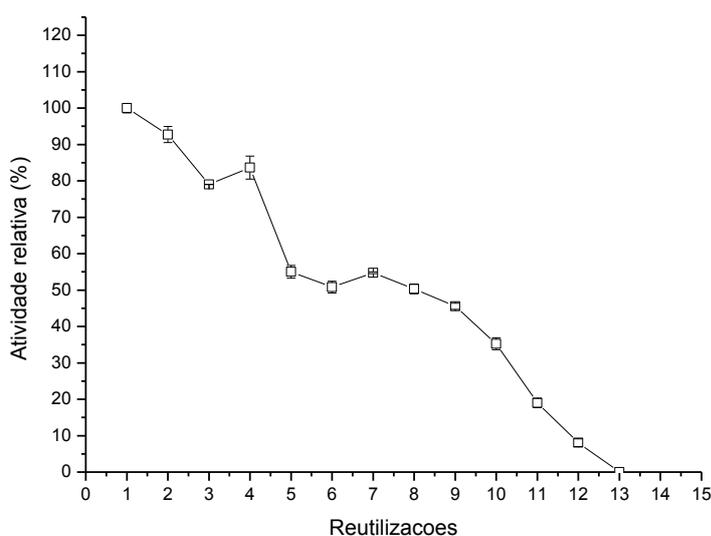


Figura 6: Número de ciclos obtidos com a reutilização da lipase imobilizada em quitosana

Além disso, ao analisar a estabilidade térmica da lipase, a Figura 7 mostra bons resultados, tendo em vista que principalmente nas temperaturas altas como 50, 55 e 60°C a atividade residual manteve-se maior até o término da exposição. Nas

temperaturas menores (35, 40 e 45°C) a lipase manteve sua atividade relativa, apresentando uma queda somente a 45°C depois de 24 horas de exposição.

Romdhane et al. (2011) também mostraram que quando a lipase é imobilizada em quitosana, sua termoestabilidade é aumentada. Por ser um método de ligação covalente, provavelmente as ligações que ocorreram entre a lipase e o suporte foram benéficas deixando sua estrutura terciária mais forte e capaz de suportar situações adversas com maior sucesso.

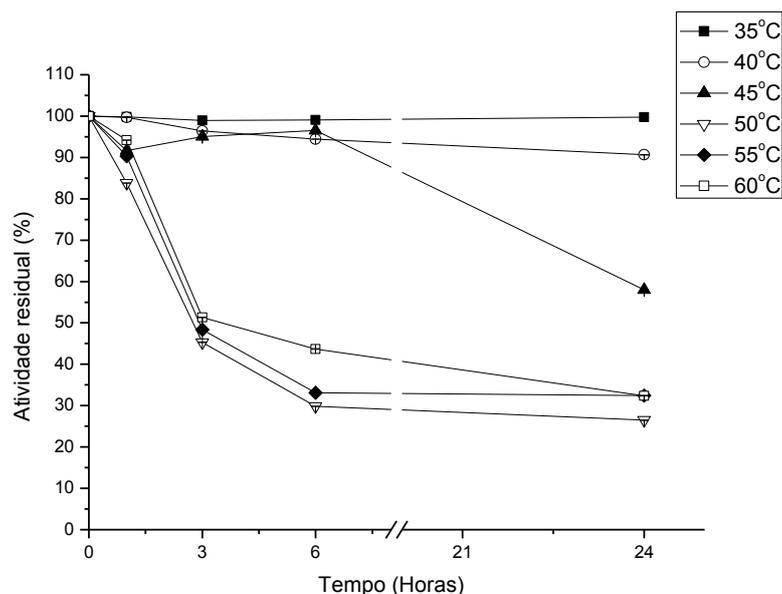


Figura 7: Estabilidade térmica da lipase imobilizada em quitosana

4. Conclusões

A caracterização parcial da lipase produzida pelo fungo *Myceliophthora* sp. n^o F2.1.4 indicou que a enzima atua em seu máximo em pH entre 5,0 e 7,0 e a 35°C sendo estável entre 35 e 50°C e em faixa de pH 4,0 e 9,0. A enzima foi sensível a SDS e Al³⁺ e tolerante a etanol e metanol, solventes utilizados na produção de biodiesel.

Quanto à especificidade aos substratos, os testes provaram ser a enzima em estudo um lipase verdadeira já que conseguiu atuar em substrato de cadeia longa. Além disso, ela atuou bem em todos os substratos naturais testados, mostrando sua eficiência para aplicações de digestão de óleos.

A lipase foi imobilizada em alginato de cálcio e, dessa forma, foi possível uma reutilização da enzima por 6 vezes consecutivas. Quando imobilizada em quitosana, a

lipase foi reutilizada por 12 vezes consecutivas. Esse resultado demonstra que os métodos de imobilização testados foram eficientes, embora a imobilização em quitosana tenha permitido um número maior de reutilizações da enzima. Em ambos os métodos, a imobilização melhorou a estabilidade da lipase quando exposta a diferentes temperaturas.

5. Referências bibliográficas

ADRIANO, W. S. Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. **Biomacromolecules**. v.9, p. 2170 – 2179. 2008.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **Biochem. J.** v. 343, p. 177 – 183. 1999.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 213–221. 2000.

BETIGERI, S.S.; NEAU, S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads, **Biomaterials** v. 23, p. 3627 – 3636, 2002.

BURKERT, J. F. M.. Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552. PhD thesis, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brazil (in portuguese). 2002.

CÔTÉ, A.; SHARECK, F. Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Enzyme and Microbial Technology** v. 42 p. 381–388. 2008.

CHIOU, S.H.; WU, W.T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**. V. 25, p. 197 – 204. 2004.

DIAZ, J. C. M.; RODRÍGUEZ, J. A.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; ABOUSALHAM, A.; CARRIERE, F.; BARATTI, J. Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. **Enzyme and Microbial Technology** v. 39, p.1042–1050. 2006.

DEMIR, B. S.; TUKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 64, p. 123-128. 2010.

EGLOFF, M. P.; RANSAC, S.; MARGUET, F.; ROGALSKA, E.; VAN TILBEURGH, H.; BUONO, G.; CABBILLAU, C.; VERGER, R. Les lipases: cinétiques, spécificités

et aspects structuraux. In: Malcata, F.X. (Ed.). Engineering of/with lipases. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

FERRATO, F.; CARRIERE, F.; SARDA, L.; VERGER, R. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzimol.**, v. 284, part B, p. 327-347. 1997.

FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA, G. L., JR. Lipase production by a new promising strain *Penicillium restrictum*. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 6-12. 1997.

FJERBAEK, J.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol. Bioeng.** v. 102, p. 1298-1315. 2009.

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

HUANG, X. J.; GE, D.; XU, Z. K. Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. **European Polymer Journal** v. 43, p. 3710-3718. 2007.

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

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

KAMINI, N. R.; MALA, J. G. S. Lipase production from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation using gingelly oil cake. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 505-511. 1998.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53-61, 2004.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal** v. 40, p. 445-451. 2008.

MATSUMOTO, M.; OHASHI, K. Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*. **Biochemical Engineering Journal** v. 14, p. 75-77. 2003.

MONDAL, K.; MEHTA, P.; MEHTA, B. R.; VARANDANI, D.; GUPTA, M. A. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1764, p. 1080–1086. 2006.

RAMANI, K.; JOHN KENNEDY, L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry** v. 45, p. 1683-1691. 2010.

RANGANATHAN S. V.; SRINIVASAN LN; MUTHUKUMAR K. An overview of enzymatic production of biodiesel. **Bioresour Technol** v. 99, p. 3975–81. 2008.

ROMDHANE, I. B. B.; ROMDHANE, Z. B.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 68, p. 230-239. 2011.

SHARMA, S.; GUPTA, M. N.; Alginate as a macroaffinity ligand and an additive for enhanced activity and thermostability of lipases, **Biotechnol. Appl. Biochem.** v. 33, p. 161–165. 2001.

SNELLMAN E. A.; SULLIVAN E. R.; COLWELL R. R. Purification and properties of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter* sp. RAG-1. **Eur J Biochem** v. 269, p.5771–9. 2002.

SINGH M.; BANERJEE U. C. Enantioselective transesterification of (RS)-1-chloro- 3-(3,4-difluorophenoxy)-2-propanol using *Pseudomonas aeruginosa* lipases. **Tetrahedron Asymmetry** v. 18, p. 2079–85. 2007.

SUPAKDAMRONGKUL, P.; BHUMIRATANA, A.; WIWAT, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 105, p. 228–235. 2010.

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

TENG, Y.; XU, Y.; WANG, D. Production and regulation of different lipase activities from *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation by lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 57, p. 292–298. 2009.

TISCHER, W.; KASCHE, V.; Immobilized enzymes: crystals or carriers. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 326–335. 1999.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends Biotechnol.**, v. 15, p.32 -38, 1997.

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