



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VANESSA HITOMI SUGAHARA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR DE *Beauveria bassiana*
EM SÍLICA GEL POR ADSORÇÃO FÍSICA**

Londrina - Paraná
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

VANESSA HITOMI SUGAHARA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR DE *Beauveria bassiana*
EM SÍLICA GEL POR ADSORÇÃO FÍSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Deptº. de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profª. Dra. Geni da Silva Varéa

**Londrina - Paraná
2010**

VANESSA HITOMI SUGAHARA

**IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE EXTRACELULAR DE *Beauveria bassiana*
EM SÍLICA GEL POR ADSORÇÃO FÍSICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Deptº. de Bioquímica e Biotecnologia, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Dra. Geni da Silva Varéa
Universidade Estadual de Londrina

Profª. Dra. Gisella Maria Zanin
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. João Batista Buzato
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 19 de março de 2010.

Dedico esta conquista ao meu noivo,
Roger Bruno Rodrigues, companheiro e
meu grande incentivador.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por mais uma etapa vencida.

A meus pais, Tereza e Luiz pelo esforço, humildade e incentivo incondicional pela educação de seus filhos.

Às minhas irmãs, Raquel e Caroline, e meus familiares pelo incentivo, compreensão e carinho.

À Professora Geni da Silva Varêa pela orientação, amizade, conselhos, pelo tempo dispendido e por ter me acolhido carinhosamente em toda minha formação acadêmica.

À Professora Dalva Tomoe Miyagui pela colaboração, ensinamentos no laboratório e pelo incentivo.

Aos colegas Rafael, Michele, Luciana, Cristina, Anelize, Leandro, Thaís, Leandra, Letícia, Kelin, Renata pelo companheirismo, trocas de experiências e pelos bons momentos compartilhados.

Às alunas de iniciação científica Carina, Polyana e Juliana pela colaboração nos experimentos, pela dedicação e amizade.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia pela contribuição em minha formação científica.

Aos funcionários do Deptº. de Bioquímica e Biotecnologia, Nelson, Sergio e Elda pela disponibilidade.

Às minhas grandes amigas, que embora não citadas nominalmente, sempre estiveram por perto demonstrando carinho, incentivo e compreensão.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

Sugahara, Vanessa Hitomi. **Imobilização de lipase extracelular de *Beauveria bassiana* em sílica gel por adsorção física**. 2010. 67f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar a imobilização de lipase produzida pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em diferentes carreadores. Oito cepas de *B. bassiana* (CG481, CG432, CG71, CG152, Unioeste 4, Unioeste 40, Bbio44 e Bbio61) foram testadas quanto à capacidade produtora de lipase em cultivos submersos em meio de Vogel acrescido de óleo de oliva 1%, uréia 1,5%, CaCl_2 0,1% e Triton X-100 0,1%, durante 4 dias, 28°C, 200 rpm. O extrato bruto obtido do cultivo de *B. bassiana* CG481 foi ultrafiltrado (membrana 100kDa) e testado para imobilização de lipase em treze diferentes tratamentos: adsorção em suportes inorgânicos (Al_2O_3 , CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, celite 545, sílica gel), ligação iônica (Amberlite MB-1 e Dowex com e sem tratamento com metanol), ligação covalente com glutaraldeído (Amberlite MB-1 e Dowex) e aprisionamento em gel (alginato e alginato/gelatina). Sílica gel foi selecionado como melhor suporte exibindo 94,8% de rendimento. Lipase de *B. bassiana* adsorvida em sílica gel (ILS) manteve as condições ótimas de atividade da enzima livre (FL) (pH 8,5 e temperatura de 45°C), porém, ILS apresentou melhora da atividade lipolítica em valores elevados de pH (9,0-10,5) e temperatura (60°C). Além disso, ILS mostrou aumento da estabilidade quando incubada em pH 7,0 por 120 h, com retenção de 69,0% da atividade inicial, enquanto FL exibiu apenas 33,3%. A estabilidade térmica de FL e ILS foi avaliada na faixa de 30 a 60°C por 1 hora em meio aquoso e em solvente orgânico (somente ILS). A 60°C, ILS exibiu aumento da estabilidade térmica tanto em meio aquoso (tampão Tris-HCl) (retenção de 64,6% de atividade residual) como em meio orgânico (n-heptano) (95,1%). Já FL manteve apenas 40,6% da atividade inicial em meio aquoso e não exibiu atividade em meio orgânico mesmo sem tratamento térmico. O tratamento de ILS com NaCl 0,8 M preveniu a dessorção de lipase enquanto Triton X-100 0,1% facilitou sua liberação para o meio. ILS foi reutilizada por quatro ciclos de esterificação, com duração de 24 h cada, com manutenção de 80,8% da atividade inicial. O estudo envolvendo a imobilização de lipase produzidas por *B. bassiana* é inédito e os resultados obtidos abrem novas perspectivas para o emprego deste biocatalisador em processos biotecnológicos, inclusive em sistemas contendo solventes orgânicos como meio reacional.

Palavras-chave: imobilização, lipase, *Beauveria bassiana*, sílica gel.

Sugahara, Vanessa Hitomi. **Immobilization of *Beauveria bassiana* extracellular lipase on silica gel by physical adsorption**. 2010. 67p. Dissertation (Master Course in Biotechnology) – Londrina State University. Londrina, 2010.

ABSTRACT

This work aimed to study the immobilization of lipase produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on different carriers. Eight strains of *B. bassiana* (CG481, CG432, CG71, CG152, Unioeste 4, Unioeste 40, Bbio44 and Bbio61) were tested for their ability to produce lipase in submerged cultures in Vogel salt broth added by 1% olive oil, 1.5% urea, 0.1% CaCl₂ and 0.1% Triton X-100 during 4 days, 28°C, 200 rpm. The crude extract obtained from the *Beauveria bassiana* CG481 was ultrafiltered (100kDa membrane) and tested for lipase immobilization in thirteen different treatments: adsorption on inorganic supports (Al₂O₃, CaCO₃, CaSO₄.2H₂O, celite 545, silica gel), ionic binding (Amberlite MB-1 and Dowex with and without treatment with methanol), covalent binding (Amberlite MB-1 and Dowex) and gel entrapment (alginate and alginate/gelatin). Silica gel was selected as the best support displaying 94.8% of activity yield. *B. bassiana* lipase adsorbed on silica gel (ILS) maintained the optimum conditions of activity of free lipase (FL) (pH 8.5 and temperature of 45 °C). However, ILS improved the lipolytic activity in higher values of pH (9.0-10.5) and temperature (60°C). In addition, ILS has shown increased stability when incubated at pH 7.0 for 120 h, with retention of 69.0% of initial activity, while FL showed only 33.3%. The thermal stability of FL and ILS was evaluated at the range of 30 to 60° C for 1 hour in aqueous medium and organic solvents (only for ILS). At 60°C, ILS exhibited increased thermal stability both in aqueous (TRIS-HCl) (64.6% residual activity) and in organic liquids (n-heptane) (95.1%). FL remained only 40.6% of initial activity in aqueous medium and exhibited no activity in organic medium. The treatment of ILS with 0.8 M NaCl prevented desorption of lipase while 0.1% Triton X-100 facilitated their release to the reaction environment. ILS was reused for four cycles of esterification reaction (24 h incubation each) and maintenance 80.8% of initial activity. The study involving the immobilization of *B. bassiana* lipase is unpublished and these results open new perspectives for the use of this biocatalyst in biotechnological processes, including systems containing organic solvents as reaction media.

Key words: immobilization, lipase, *Beauveria bassiana*, silica gel.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	11
2.1.1 Métodos de Imobilização de Enzimas	12
2.1.1.1 Adsorção	13
2.1.1.2 Ligação covalente.....	15
2.1.1.3 Ligações cruzadas	15
2.1.1.4 Aprisionamento	16
2.2 LIPASES.....	17
2.2.1 Definição e Classificação	17
2.2.2 Mecanismo de Ativação Interfacial	20
2.2.3 Fontes de Lipases.....	22
2.2.4 Lipases de Fungos Filamentosos	23
2.2.4.1 <i>Beauveria bassiana</i>	23
2.2.5 Aplicações Biotecnológicas.....	24
2.2.5.1 Aplicações das lipases como hidrolases.....	24
2.2.5.2 Aplicações das lipases como sintetases.....	25
2.3 LIPASES IMOBILIZADAS.....	27
2.3.1 Imobilização de Lipases por Adsorção	27
2.3.2 Imobilização de Lipases por Ligação Covalente.....	28
2.3.3 Imobilização de Lipases por Aprisionamento	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVOS GERAIS	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 PREPARO DO INÓCULO	31
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARO DA AMOSTRA.....	31
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA	32

4.4 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	33
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS	33
4.6 SELEÇÃO DE SUPORTE E TÉCNICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE <i>B. bassiana</i>	33
4.6.1 Adsorção.....	34
4.6.2 Ligação Iônica	34
4.6.3 Ligação Covalente	34
4.6.4 Aprisionamento em Gel	34
4.6.5 Cálculo dos Parâmetros da Imobilização	35
4.7 ESTUDOS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DE LIPASE DE <i>B. bassiana</i> ADSORVIDAS EM SÍLICA GEL	36
4.7.1 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Atividade de Lipases nas Formas Livre e Imobilizada.....	36
4.7.2 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Estabilidade de Lipases nas Formas Livre e Imobilizada.....	36
4.7.3 Estabilidade Operacional de Lipase Adsorvida em Sílica gel.....	36
4.8 EFEITO DO NaCl E TRITON X-100 SOBRE A DESSORÇÃO DE LIPASE DE <i>B. bassiana</i> ADSORVIDA EM SÍLICA GEL.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas de grande potencial biotecnológico capazes de catalisar diversos tipos de reações tanto em ambientes aquosos e como em solventes orgânicos. Juntamente com proteases e carboidrases, as lipases compõem o grupo de biocatalisadores mais comercializados atualmente, representando a terceira enzima de maior produção mundial e o biocatalisador de maior aplicação em biocatálise e química orgânica (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008).

A grande maioria dos estudos envolvendo lipases concentra-se em fontes de origem microbiana, devido às facilidades de produção da enzima e abundância de espécies. Entre os microrganismos, os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores de lipases (COLEN, 2006). Dentro desse grupo, os fungos entomopatogênicos apresentam algumas vantagens como a inocuidade para a maioria das espécies animais além de estarem abundantemente distribuídos na natureza.

O principal motivo para o crescente interesse nas lipases é a versatilidade biotecnológica apresentada por estas enzimas, que possuem a capacidade de catalisar diferentes tipos de reações como hidrólise, interesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise e aminólise. Além disso, apresentam uma ampla gama de substratos e interessantes propriedades de estereoespecificidade e regiosseletividade (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; HASAN, SHAH e HAMEED, 2009).

Essas características das lipases possibilitam numerosas aplicações que abrangem a indústria alimentícia e farmacêutica, a produção de detergentes, o tratamento de efluentes, a indústria têxtil, o curtimento do couro, entre outros (HASAN, SHAH e HAMEED, 2009). No entanto, como ocorre com outras enzimas empregadas em operações industriais, o emprego das lipases pode ser limitado pelo o alto custo de produção e purificação, dificuldades de recuperação ao final do processo e a baixa estabilidade enzimática.

Uma alternativa para solucionar essas dificuldades é a utilização de enzimas imobilizadas, que frequentemente exibem aumento de estabilidade e possibilitam o emprego destas enzimas em reatores contínuos, sem necessidade de renovação do catalisador. Além disso, o emprego desta técnica permite a separação dos produtos de reação, melhor controle dos parâmetros da reação e a aplicação de enzimas em reações orgânicas (MATEO *et al.*, 2007).

Lipases têm sido relacionadas com a ação de fungos entomopatogênicos e apresentam, juntamente com proteases e quitinases, importante papel na penetração do fungo através do exoesqueleto de insetos.

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* apresenta-se distribuído em quase todos os países e é um conhecido produtor de lipases. Esta enzima, junto com proteases e quitinases, têm sido estudadas com foco no controle biológico de insetos-praga, porém pouco exploradas quanto as suas aplicações biotecnológicas.

Este trabalho avaliou diferentes suportes e técnicas para a imobilização de lipase extracelular produzida por *B. bassiana* CG481, e o efeito da adsorção em sílica gel sobre a atividade e estabilidade enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

A utilização de enzimas imobilizadas é uma estratégia muito promissora para a condução de bioprocessos contínuos. Aliado à engenharia, bioquímica, microbiologia e genética, esta tecnologia pode ser utilizada como ferramenta para aumentar a eficiência de processos biotecnológicos, e consequentemente, reduzir os custos de produção.

Enzimas imobilizadas foram obtidas pela primeira vez por Nelson e Griffim (1916), com a adsorção da enzima invertase em carvão ativo e alumina. No entanto, o interesse pela tecnologia de imobilização de enzimas apresentou avanços somente a partir da década de 60, com a implantação do primeiro processo industrial em 1969 no Japão, para produção de L-aminoácidos (ZANIN e MORAES, 2004).

A Primeira Conferência em Engenharia Enzimática em Henniker (EUA), realizada em 1971, estabelece que “enzimas imobilizadas são enzimas ou sistemas enzimáticos fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida ou continuamente”. Em trabalhos mais antigos os termos insolubilização, ligação, complexo e conjugação também podem ser encontrados como sinônimos (ZANIN e MORAES, 2004).

A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes, podem ser superadas por meio da imobilização (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2006; NICOLIC, SRDIC e ANTOV, 2009).

Do ponto de vista econômico, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas são: uso em processos contínuos, possibilitando maior controle das variáveis do processo; facilidade de separação do produto de reação; aumento de estabilidade; diminuição do volume de reação, pois a imobilização permite a concentração enzimática; e a reutilização do biocatalisador, com aproveitamento prolongado de sua atividade catalítica (CHANG *et al.*, 2007; DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004; MINOVSKA, WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 2005).

As enzimas imobilizadas podem estar ligadas ao suporte ou fisicamente confinadas no interior de uma matriz sólida, tornando-se insolúveis e facilmente separadas da mistura

reacional, tanto em reatores contínuos como em sistemas de batelada (KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

O método e o suporte empregados em um determinado processo são estabelecidos empiricamente e dependem basicamente da característica do material e das condições de uso do sistema imobilizado (CHEETAM, 1985). Dessa maneira, pode-se afirmar que não existe um método geral de imobilização ou um suporte universal adequado para qualquer tipo de processo.

Carreadores inorgânicos utilizados para a imobilização de enzimas apresentam numerosas vantagens em relação aos polímeros orgânicos, como alta resistência mecânica, estabilidade térmica e química, resistência a solventes orgânicos e ao ataque de microrganismos.

Os suportes utilizados para imobilização de enzimas podem ser classificados morfológicamente em porosos e não-porosos, hidrofílicos e hidrofóbicos, naturais ou sintéticos. Suportes não-porosos possuem a desvantagem da pequena área para imobilização no qual a enzima se fixa na superfície, onde há formação de várias camadas de enzimas com forças de interação cada vez menores (MATEO *et al.*, 2007). No entanto, estes suportes são resistentes a altas pressões e, como a enzima está em contato direto com o microambiente reacional, os efeitos difusionais envolvendo substratos e produtos são mínimos. Os suportes porosos, por sua vez, apresentam como principal vantagem a grande superfície para imobilização em sua estrutura interna, além de proteger a enzima de turbulências do meio reacional. Dependendo da organização e tamanho dos poros, podem ocorrer dificuldades difusionais de substratos e produtos nesse caso (MESSING, 1975).

Embora existam muitos trabalhos publicados na área, a aplicação industrial da tecnologia de imobilização enzimática em escala industrial ainda é pouco empregada. Os principais fatores para tal fato são o custo elevado da maioria dos suportes; baixa eficiência e estabilidade operacional; pequena demanda do produto, que não incentiva a produção de enzimas imobilizadas em larga escala (KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

2.1.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Inúmeros métodos de imobilização têm sido descritos na literatura para melhorar a estabilidade e otimizar o emprego de enzimas em processos industriais, pois seu uso na forma

livre e purificada, e o posterior descarte normalmente representam um processo dispendioso e caro (DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

A classificação dos métodos de imobilização de enzimas é realizada de acordo com o tipo de interação responsável pela imobilização e pela natureza do suporte, e são divididos em dois grandes grupos: ligação na superfície do suporte sólido ou imobilização por inclusão (Figura 1) (KENNEDY e WHITE, 1985; ZANIN e MORAES, 2004). Enzimas podem ser fixadas na superfície do suporte por adsorção física, ligação iônica, ligação covalente, quelatação, ou estar incluída em matrizes gélidas, fibrosas ou em microcápsulas.

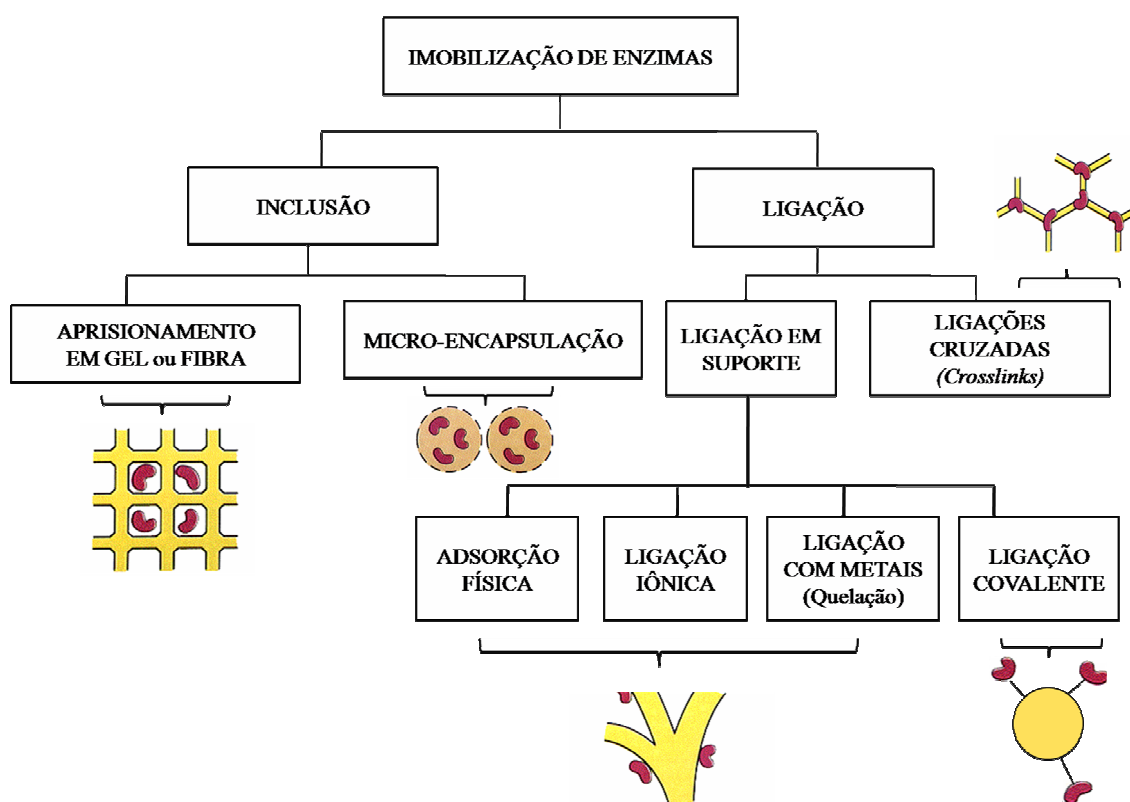


Figura 1- Classificação dos métodos de imobilização de enzimas (Adaptado de ZANIN e MORAES, 2004).

2.1.1.1 Adsorção

A imobilização por adsorção é a técnica mais simples, geralmente mais barata e baseia-se na adsorção física ou no estabelecimento de ligações iônicas entre enzima e carreador. Nesta técnica são estabelecidas forças de interação de baixa energia, como

interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou ligações hidrofóbicas (CHANG *et al.*, 2007).

Por apresentarem interações mais fracas, as enzimas imobilizadas por adsorção são desorvidas com mais facilidade quando em meio aquoso, não sendo adequadas para aplicação em processos no qual as mesmas não devem estar presentes no produto final. Já em sistemas orgânicos, a utilização de enzimas imobilizadas por este método é apropriado, pois o desligamento da enzima do suporte dificilmente ocorre devido à sua baixa solubilidade do biocatalisador nestes sistemas, facilitando também a recuperação do imobilizado para reutilização (WU *et al.*, 2007).

Em suportes portadores de cargas elétricas ocorre a formação de ligações iônicas entre enzima e suporte, além de ligações de baixa energia que podem ser estabelecidas, garantindo grande estabilidade ao sistema.

Metais de transição têm sido utilizados no preparo de enzimas imobilizadas com a obtenção de quelatos. Os principais metais empregados incluem o titânio III, titânio IV e zircônio, com formação de óxidos poliméricos ou hidróxidos (KENNEDY e WHITE, 1985).

A adsorção ocorre pelo simples contato entre enzima e suporte seguido de lavagem para eliminação das macromoléculas não retidas. Além disso, o rendimento da técnica pode ser melhorado com uma etapa adicional de precipitação enzimática com acetona gelada (WU *et al.*, 2007).

Geralmente, a máxima adsorção de lipases ocorre em valores de pH próximo ao ponto isoelétrico da enzima e a afinidade é maior com o aumento da hidrofobicidade do suporte. Além disso, muitas lipases apresentam aumento de atividade quando adsorvidas em carreadores hidrofóbicos, devido a mudanças conformacionais que tornam seu sítio ativo acessível aos substratos (MATEO *et al.*, 2007). Tal fato ocorre devido à similaridade da superfície destes suportes com os substratos naturais (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; GUPTA *et al.*, 2005). Além disso, a eficiência do processo de adsorção depende de fatores como pH da solução, natureza do solvente, força iônica do meio, concentração de enzima e suporte, e temperatura (ZABORSKI, 1973, p.75).

Os suportes mais comumente utilizados são alumina, sílica, celite, cerâmica, vidros porosos, carvão ativo, argila, colágeno, terra de diatomáceas, hidroxiapatita, amberlite, dowex, sephadex, sepharose (CANILHA, CARVALHO e SILVA, 2006; DALLA-VECHIA, NASCIMENTO e SOLDI, 2004).

2.1.1.2 Ligação covalente

A imobilização covalente oferece grandes vantagens para o uso de enzimas em biorreatores industriais, como o aumento da estabilidade enzimática e a ausência de perdas para o meio reacional.

Entre os métodos de imobilização de enzimas, a técnica que emprega ligações covalentes é a mais pesquisada, porém a mais difícil, pois frequentemente envolve perdas de atividade. Tal fato ocorre devido às ligações produzidas, que devem ocorrer entre um grupo funcional da enzima que não está envolvido na ação catalítica e o suporte (KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

Métodos para prevenir a inativação do sítio ativo enzimático, com obtenção de altos rendimentos de atividade, incluem o pré-tratamento da enzima com inibidor competitivo ou substrato, indução de ligações multipontuais e utilização de zimogênio (LEE *et al.*, 2006). Uma outra técnica que obtém enzimas imobilizadas mais ativas e estáveis é a introdução de espaçadores entre enzima e suporte, como por exemplo a hexametenodiamina (HEMDA), que aumentam a mobilidade do catalisador.

Os grupamentos amino, carboxílico, fenólico, sulfidrílico, hidroxílico, imidazólico e indólico representam os grupos reativos da enzima que se ligarão ao suporte. Estes podem conter grupos diazônio, isocianeto, haleto e azida (KENNEDY e WHITE, 1985).

Os suportes que não apresentarem grupos reativos devem ser previamente ativados por meio de reações como diazotização, formação de ligação amida, formação de base de Schiff ou alquilação (WINGARD, KATCHALSKI-KATZIR e GOLDSTAIN, 1976). Nesses casos, a ligação covalente é formada pela inclusão de pontes moleculares, como o CNBr e o glutaraldeído, no qual seus grupamentos reativos reagem facilmente com os grupos amino da enzima e do suporte (ZABORSKI, 1973, p.14). Estes grupamentos amino do catalisador (amino terminal e do resíduo lisina) são preferidos para a formação das ligações covalentes com estes suportes ativados, pois na grande parte das enzimas o resíduo de aminoácido lisina não está envolvido no sítio catalítico. Grupamentos epóxi ou glioxil também são considerados apropriados para esta finalidade (MATEO *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Ligações cruzadas

A formação de múltiplas ligações covalentes entre enzimas, os chamados *crosslinks*, ocorre pelo emprego de reagentes bi ou multifuncionais com produção de agregados

enzimáticos insolúveis em água, sem a utilização de um suporte sólido (KENNEDY e WHITE, 1985).

Os reagentes necessários para imobilização possuem em sua estrutura dois grupos funcionais que incluem grupamentos carboxila, que reagem com resíduos de L-lisina; grupamentos diazo, reativos com resíduos de L-lisina, L-histidina, L-tirosina; L-arginina ou L-cisteína; isocianatos, que reagem com grupos amino de peptídeos; alquil-iodetos capazes de alquilar resíduos nucleofílicos; e iodoacetamidas, reativos com resíduos de L-cisteína. O glutaraldeído tem sido o reagente bifuncional mais amplamente utilizado para imobilização de enzimas por meio de *crosslinks* (KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

As ligações intermoleculares e irreversíveis obtidas garantem estabilidade em valores extremos de pH e temperatura. Porém, as dificuldades de controle da reação de imobilização, o requerimento de grande quantidade de enzima e perdas de atividade envolvendo o sítio catalítico são algumas das desvantagens apresentadas por este método (ZANIN e MORAES, 2004).

2.1.1.4 Aprisionamento

O método de imobilização por inclusão é baseado na retenção de enzimas dentro de uma rede composta por matriz polimérica ou membrana que impede a liberação do biocatalisador, porém permite o livre trânsito de substratos e produtos. Assim, a vantagem desta técnica está na ausência de interações entre a enzima e o polímero, evitando, portanto, a desnaturação enzimática (KENNEDY e WHITE, 1985).

Entretanto a transferência de massa, relacionada com a entrada de substratos e saída de produtos da catálise, pode estar comprometida dependendo da porosidade da matriz. Esta característica restringe imediatamente a aplicação de reações que envolvam moléculas de substratos ou produtos muito grandes e para isso, a porosidade da matriz deve ser criteriosamente controlada (ZANIN e MORAES, 2004).

O aprisionamento de enzimas em géis poliméricos tem ocorrido em materiais como alginato, gelatina, carragena e agarose, que possuem algumas vantagens como serem atóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis, sendo adequado para utilização em alimentos e aplicações clínicas (SEBRÃO *et al.*, 2007).

A imobilização por inclusão nas microcavidades de fibras possui vantagens sobre a imobilização em géis, como a resistência em valores de pHs extremos, forças iônicas muito altas, solventes orgânicos, altas temperaturas e, dependendo do material utilizado, resistência

triacilgliceróis, como por exemplo, a lipase produzida por *Geotrichum candidum* que atua somente sobre substratos contendo ácidos graxos de cadeia longa e dupla ligação *cis* na posição 9 (MACRAE e HAMMOND, 1985). A **lipases enantiosseletivas** apresentam capacidade de resolução de misturas racêmicas quirais ou pró-quirais, propriedade muito explorada na produção de fármacos (JAEGER e EGGERT, 2002).

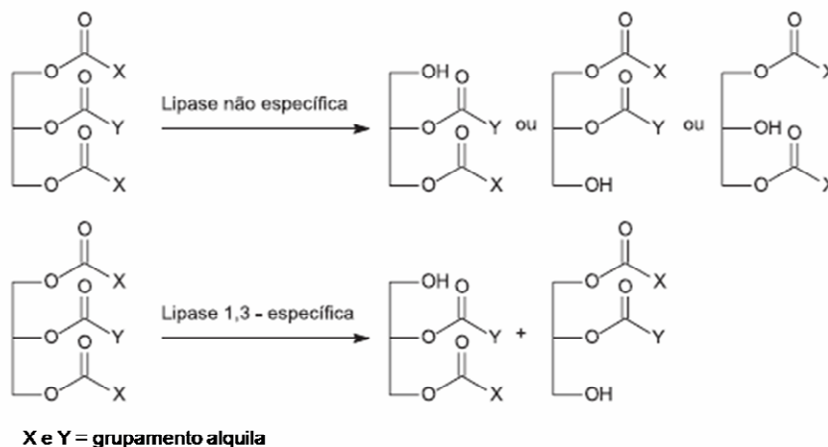


Figura 3- Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3-específica (Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006).

Muitas vezes lipases são confundidas com esterases (EC 3.1.1.1), que são carboxil éster hidrolases com atividade restrita à hidrólise de substratos hidrossolúveis e de cadeia carbônica curta, enquanto lipases exibem elevada atividade sobre ácidos graxos de cadeia longa e de baixa solubilidade em água (FOJAN *et al.*, 2000; JAEGER *et al.*, 1994). Sarda e Desnuelle (1958) classificaram as lipases como enzimas que necessitam de ativação na presença de substratos hidrofóbicos emulsionados, ou seja, uma interface óleo-água, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação.

A especificidade de substrato também tem sido utilizada como parâmetro para a diferenciação entre lipases e esterases, já que os substratos naturais de lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia longa, enquanto as esterases atuam sobre substratos constituídos por ligações ésteres únicas. É também importante mencionar que a maioria das lipases também atuam sobre substratos de esterases, porém o inverso não ocorre (FOJAN *et al.*, 2000). Além disso, lipases apresentam estabilidade em meio orgânico e não necessitam de cofatores como outras enzimas extracelulares de origem microbiana (JAEGER e REETZ, 1998).

As lipases apresentam grande versatilidade catalítica atuando sobre diversos tipos de reações, além da hidrólise, como interesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise,

aminólise e lactonização (PAQUES e MACEDO, 2006). A esterificação comum ocorre a partir de ácidos graxos e glicerol, e reações de transesterificação, estas muito exploradas em processos biotecnológicos, no qual o doador do grupo acila é um éster. Dependendo do aceptor acila, estas reações de transesterificação são denominadas glicerólise (glicerol) ou alcoólise (álcool). Já em reações do tipo interesterificação, o grupo acila é trocado entre moléculas de éster ou entre moléculas de ésteres e ácidos graxos (CARDENAS *et al.*, 2001; JAEGER e EGGERT, 2002) (Figura 4).

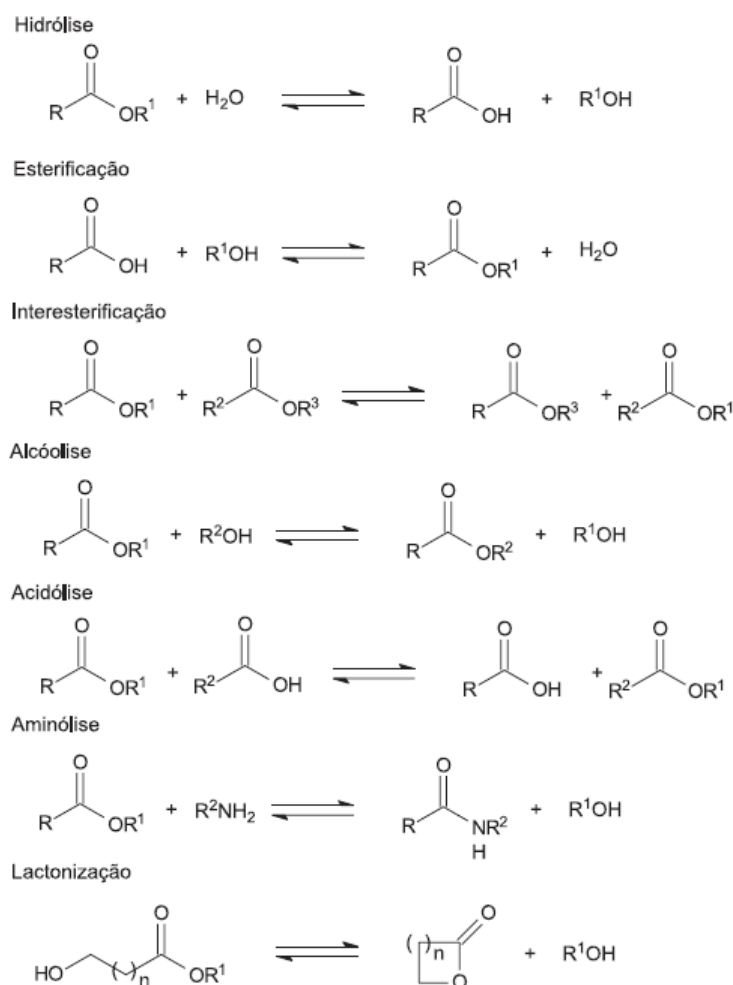


Figura 4- Reações catalisadas por lipases (Fonte: PAQUES e MACEDO, 2006).

Estas reações são direcionadas pelo conteúdo de água da reação de modo que, em ambientes aquo-restritos, as lipases catalisam reações sintéticas, que apresentam grande potencial para aplicação industrial. Porém, o interesse pela utilização de enzimas na síntese orgânica aumentou somente nos últimos anos, pois até a década de 80 prevalecia o conceito de que as enzimas mantinham-se cataliticamente ativas somente em meio aquoso.

2.2.2 Mecanismo de Ativação Interfacial

O fenômeno da ativação interfacial descreve o aumento da atividade lipolítica sobre substratos hidrofóbicos quando estes são emulsionados. Esta reação ocorre na presença da interface lipídio-água e, dessa forma, não obedece a cinética descrita de Michaelis e Menten, como as esterases. Este fenômeno é observado quando, em concentrações de substrato muito baixas, as lipases não mostram atividade. No entanto, quando a concentração desse substrato ultrapassa a concentração micelar crítica (CMC), ou seja, a mínima concentração necessária para a emulsificação do substrato, é observado um aumento brusco de atividade (Figura 5) (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974; JAEGER *et al.*, 1999).

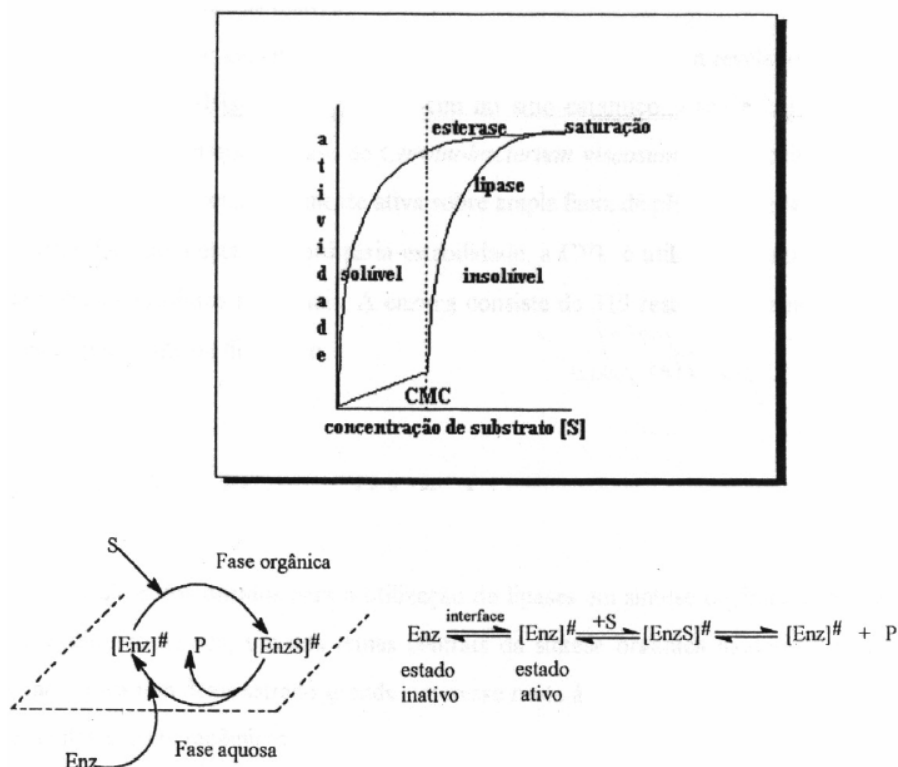


Figura 5- Comportamento cinético de lipases e esterases (SANTOS, 2003).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana (BRADY *et al.*, 1990; WINKLER, D'ARCY e HUNZIKER, 1990) confirmou a presença de uma tríade catalítica no sítio ativo das lipases, formado pelos aminoácidos serina, aspartato ou glutamato e histidina, reforçando a classificação destas enzimas como serino hidrolases (Figura 6) (JAEGER *et al.*, 1994). Além disso, estes estudos

permitiram uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial, no qual o sítio ativo destas enzimas foi encontrado coberto por uma tampa hidrofóbica ou *lid*. A interação desta estrutura com a interface lipídeo-água provocaria uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo à ligação éster do substrato (Figura 7) (FOJAN *et al.*, 2000).

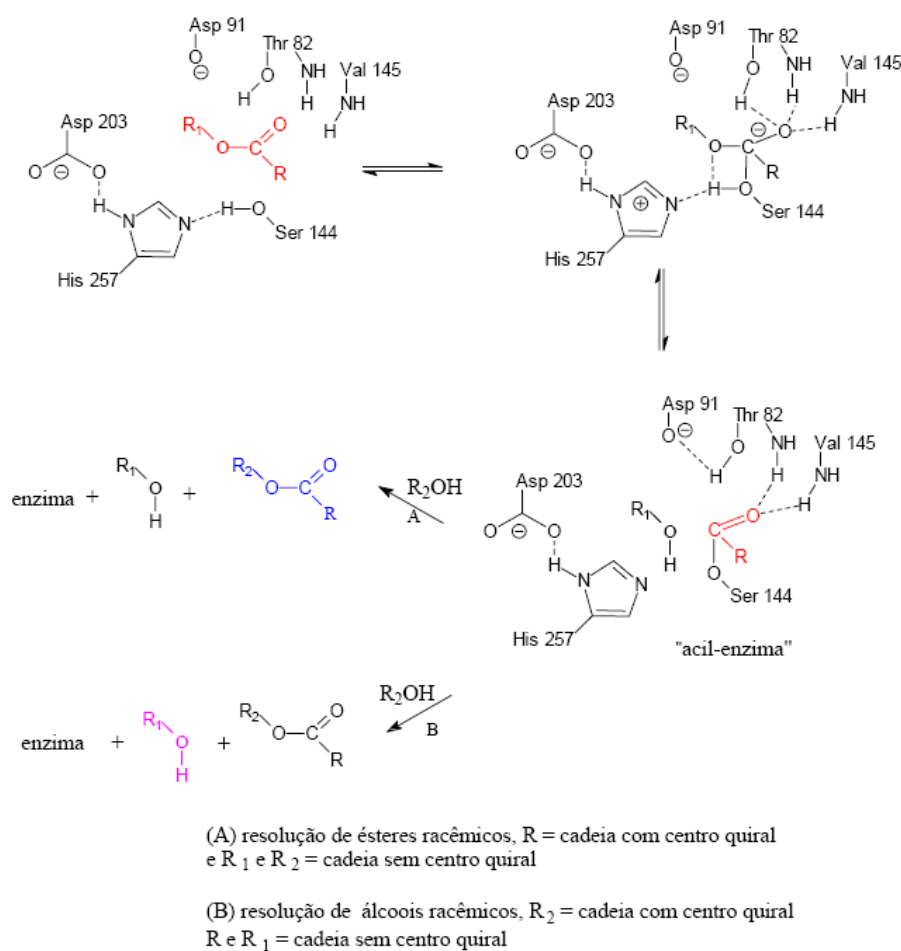


Figura 6- Mecanismo catalítico de lipases baseado na “tríade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina, e ácido aspártico ou glutâmico, na resolução cinética de ésteres racêmicos (A) e álcoois racêmicos (B). Os números dos resíduos de aminoácidos se referem à lipase de *Rhizopus oryzae* (SCHMID e VERGER, 1998).

Em estudos posteriores, entretanto, observou-se que a presença dessa tampa não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, tendo sido descrito que lipases de

Pseudomonas aeruginosa, *Burkholderia glumae* e *Candida antarctica* B apresentam a *lid* em suas estruturas, mas não sofreram ativação interfacial (JAEGER e REETZ, 1998). Ferrato *et al.* (1997) observaram que a ativação interfacial é influenciada pelos tipos de enzima, substratos e condições experimentais empregados, e a presença da *lid* ou do fenômeno de ativação interfacial não são características genéricas de todas as lipases.

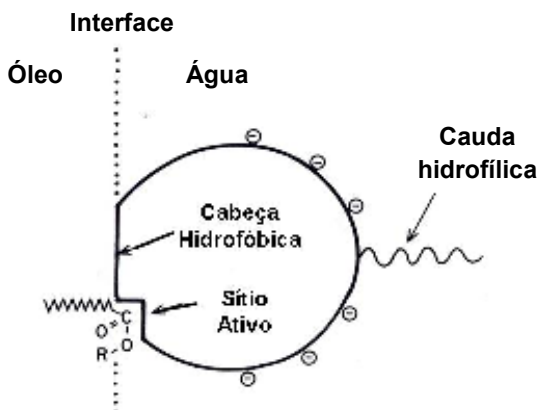


Figura 7- Modelo hipotético da ação da tampa hidrofóbica de uma lipase pancreática ao receber seu substrato na interface óleo/água (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974).

2.2.3 Fontes de Lipases

As lipases ocorrem amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas tanto em microrganismos como em animais e vegetais. No entanto, lipases microbianas são as mais utilizadas em processos industriais devido à relativa facilidade de produção e abundância de espécies capazes de sintetizá-las.

Por apresentar importância fisiológica no metabolismo microbiano para obtenção de fonte de carbono e energia, as lipases atuam como fator de virulência em infecções provocadas por microrganismos. Dentro desse grupo, lipases produzidas por fungos têm sido preferencialmente estudadas por apresentarem propriedades cinéticas mais vantajosas que as de origem bacteriana, além da grande maioria das lipases fúngicas não apresentarem perigos à saúde humana, sendo reconhecidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) (COLLEN, 2006; JAEGER *et al.*, 1994).

Por outro lado, o rápido crescimento celular das bactérias é uma vantagem para utilização desta fonte de lipases (JAEGER, DIJKSTRA e REETZ, 1999). Dentre as bactérias

produtoras, estão comercialmente disponíveis as enzimas de *Pseudomonas* sp., *P. fluorescens* e *Burkholderia cepacia* para a aplicação em síntese quiral, e lipases de *Burkholderia* sp. e *Arthrobacter* sp., utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis.

Dentre as leveduras, a capacidade de sintetizar lipases está limitada aos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Torulopsis* e *Yarrowia*, com destaque para a espécie *Candida rugosa* (COLEN, 2006).

2.2.4 Lipases de Fungos Filamentosos

Lipases extracelulares são excretadas em quantidades significativas por diferentes espécies de fungos filamentosos quando estes são submetidos a condições adequadas de cultivo, muitas vezes com a adição de indutores, como óleo de oliva e óleo de nim (GULATI *et al.*, 2005; HEGEDUS e KACHATOURIANS, 1988).

Apesar do grande número de lipases de origem fúngica descritas na literatura, somente algumas enzimas têm se mostrado estáveis para aplicação industrial. Os gêneros reconhecidos como melhores produtores de lipases são *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Thermomyces* (COLEN, 2006).

Novos estudos envolvendo fungos entomopatogênicos produtores de lipases apresentam vantagens como a ampla distribuição desses fungos na natureza (CRUZ *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2005) e a ausência de patogenicidade para a maioria dos animais e seres humanos (HEALTH CANADA, 2009).

2.2.4.1 *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana é um dos fungos entomopatogênicos mais extensivamente estudados da atualidade e um conhecido produtor de enzimas extracelulares (HEGEDUS e KHACHATOURIANS, 1988).

Pertencente ao filo Ascomycete e à classe Deuteromycetes, *B. bassiana* é capaz de causar infecção e morte em vários insetos. Atualmente, tal característica é muito explorada no controle biológico de insetos pragas, pela inoculação de seus esporos no campo (ALVES, 1998; GILLESPIE, 1988).

A infecção por *B. bassiana* inicia-se pelo contato e adesão do conídio à cutícula do hospedeiro. Após germinação, com formação do tubo germinativo, este penetra através da cutícula por meio da ação mecânica, exercida pelo crescimento do fungo, e da ação

enzimática (BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1987; St-LEGER, COOPER e CHARNLEY, 1986).

A cutícula dos insetos é constituída por proteínas e quitina, associadas a lipídios e compostos fenólicos, que devem ser hidrolisados por enzimas extracelulares, como proteases (BIDOCHKA e KHACHATOURIANS, 1987), quitinases (St-LEGER, COOPER e CHARNLEY, 1986a) e lipases (HEGEDUS e KHACHATOURIANS, 1988) permitindo a penetração do fungo. Além disso, a ação destas enzimas disponibiliza monômeros solúveis e componentes de baixa massa molecular que auxiliarão no metabolismo fúngico.

Após passagem pelo tegumento, o fungo é capaz de se multiplicar na hemolinfa, utilizando os nutrientes solúveis do hospedeiro. Após a morte do inseto, que ocorre devido ao acúmulo de toxinas e outros metabólitos fúngicos, o micélio se desenvolve, emerge por meio dos orifícios do cadáver e se dissemina na natureza (SAMSINAKOVA, MISIKOVA e LEOPOLD, 1971; MOORE-LANDECKER, 1990, p.430).

As lipases excretadas são responsáveis pelo fracionamento dos lipídios (óleos e gorduras) presentes na superfície dos insetos, para posterior metabolização pelo microrganismo (ALVES, 1998). Hegedus e Kachatourians (1988) estudaram a produção de lipases extracelulares por *B. bassiana*, pelo cultivo submerso em meio líquido de dextrose, peptona e extrato de levedura (YPD). Foi observada produção de lipases após adição de óleo de oliva ao meio, porém, a adição de ácidos graxos (ácidos mirístico, palmítico, esteárico, oléico e aracdônico) inibiu o crescimento e a produção de lipases.

2.2.5 Aplicações Biotecnológicas

2.2.5.1 Aplicações das lipases como hidrolases

O mais importante campo de aplicação de lipases como hidrolases é a sua adição em detergentes, tanto para uso doméstico, como em hospitais, lavanderias e indústrias (VARANASIA *et al.*, 2001). Estima-se que são adicionadas 1000 toneladas de lipases em 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano. As lipases empregadas para esta finalidade devem apresentar características como baixa especificidade de substrato, devido à variedade de triglicerídeos em amostras lipídicas e estabilidade dentro das condições de lavagem (pH 10 - 11 e 30 - 60°C) e diante de aditivos presentes na formulação do detergente (proteases, surfatantes) (JAEGER *et al.*, 1999).

Em 1988 foi lançado pela Novo Nordisk o produto Lipolase[®], que contém lipases do fungo *Thermomyces lanuginosa* (*Humicola lanuginosa*) expressos em *Aspergillus niger*. Este produto é utilizado mundialmente na manufatura de detergentes e sabões em pó por empresas como a Procter & Gamble e Unilever (JAEGER *et al.*, 1994). Outros exemplos são o Lumafast[®] (Gencor) e Lipomax[®] (Gist Brocades), que empregam lipases de *Pseudomonas putida* e *P. pseudoalcaligenes*, respectivamente (COLEN, 2006).

A hidrólise de acilgliceróis catalisada por lipases é uma alternativa à hidrólise química para a obtenção de monoacilgliceróis, estes aplicados como agentes emulsificantes em alimentos e cosméticos (JAEGER *et al.*, 1994).

Outra aplicação de crescente importância comercial é a utilização de lipases na indústria papaleira, para remoção de componentes hidrofóbicos presentes na madeira, como triacilgliceróis e ceras, que dificultam a manufatura do papel (BAJPAI, 1999; GANDHI, 1997; JAEGER *et al.*, 1998).

A adição de lipases em águas residuais, para redução do conteúdo lipídico, têm sido um importante campo de aplicação em laticínios, matadouros, indústrias extratoras de óleo e restaurantes (MENDES *et al.*, 2005; SEITZ, 2007). Além disso, as lipases tem sido exploradas para a produção de biossensores (CHAUBEY *et al.*, 2006), adição de aromas em produtos lácticos como queijos, manteiga, margarina e leite (SEITZ, 2007) e no curtimento do couro (GANDHI, 1997).

2.2.5.2 Aplicações das lipases como sintetases

Lipases têm sido exploradas pela síntese orgânica há alguns anos na catálise quimio, regio e estereosseletiva. Uma das mais prósperas aplicações está no emprego destes biocatalisadores em transformações enantiosseletivas orgânicas, tanto para a modificação de substratos próquirais como para resolução de racematos (PILISSÃO, 2006).

Geralmente lipases atuam preferencialmente sobre moléculas próquirais ou quirais de ésteres de alcoóis e ácidos carboxílicos, porém nos últimos anos houve uma expansão na gama de substratos aplicáveis, atuando também sobre dióis, β - e α -hidroxi ácidos, lactonas, aminas, entre outros (JAEGER *et al.*, 1998). Fármacos, agroquímicos e compostos aromáticos geralmente apresentam-se como compostos ou complexos quirais. Além disso, na maioria das vezes, somente uma das formas enantioméricas de drogas são farmacologicamente ativas (GIORNO *et al.*, 2007; JAEGER e EGGERT, 2002; LIU *et al.*, 2004).

Os componentes aromáticos exibem um perfil bem distinto dependendo da sua enantioforma (ABBAS e COMEAU, 2003; SCHRADER *et al.*, 2004). Ésteres aromáticos obtido de reações mediadas por lipases possuem alto valor comercial, ao contrário dos aromas produzidos por síntese química que são pouco valorizados por não serem considerados produtos naturais (SALAH *et al.*, 2007; SERRI, KAMARUDDIN e LONG, 2006).

Existem muitos estudos publicados na área da química fina, porém a aplicação industrial das lipases ainda é muito limitada, devido à enantiosseletividade insuficiente, baixa atividade, dificuldades na reutilização e limitações de produção. Um exemplo de sucesso é a síntese de (2R,3S)-3-(4-metoxifenil)metilglicidato por lipases de *Serratia marcescens*, utilizado na produção do antagonista de cálcio Diltiazem[®] (SHIBATANI, NAKAMICHI e MATSUMAE, 1990).

A imobilização geralmente é acompanhada de aumento da estabilidade em solventes orgânicos (JAEGER *et al.*, 1998). Além disso, o uso de solventes orgânicos com meio de reação apresenta muitas vantagens em relação ao tradicional sistema aquoso, como o aumento da solubilidade da enzima em substratos hidrofóbicos, melhora da termoestabilidade e eliminação de contaminação com microrganismos (DOUKYU e OGINO, 2010).

Na indústria alimentícia lipídios contendo ácidos graxos de cadeia longa e poliinsaturados são muito mais valorizados devido às suas propriedades nutricionais. Lipídios “enriquecidos” com estes tipos de ácidos graxos podem ser produzidos por reações de transesterificação mediada por lipases para adição em alimentos (CARVALHO *et al.*, 2003).

Outra aplicação das lipases muito estudada atualmente é a produção do biodiesel, combustível originado de fontes renováveis como soja e milho. A conversão dos óleos vegetais em metil ésteres ou ésteres de alcoóis de cadeia curta é catalisado em uma única reação de transesterificação utilizando lipases em meio orgânico (NOUREDDINI *et al.*, 2005; WATANABE *et al.*, 2000). Porém, devido aos altos custos envolvendo a síntese enzimática, a produção industrial por meio de biocatalisadores ainda não é explorada (JAEGER e EGGERT, 2002).

Lipases também podem catalisar a produção de compostos biodegradáveis como: o butil oleato, produzido pela esterificação direta de butanol e ácido oléico, e utilizado na diminuição da viscosidade do biodiesel em situações de baixa temperatura; ésteres de trimetilpropano, utilizados como lubrificantes automotivos; e polímeros formados a partir de diésteres ou dióis (HASAN, SHAH e HAMEED, 2006). Já lipases de *Pseudomonas* sp. são capazes de catalisar a transesterificação de diferentes monossacarídeos com vinilacrilatos,

resultando em poliésteres de açúcar-acrilato, utilizados em aplicações clínicas (JAEGER *et al.*, 1994)

2.3 LIPASES IMOBILIZADAS

2.3.1 Imobilização de Lipases por Adsorção

Por apresentar-se como uma técnica bastante simples, é encontrado na literatura um grande número de protocolos envolvendo imobilização de lipases via adsorção. Malcata *et al.* (1990) e Balcão, Paiva e Malcata (1996) revisaram extensivamente diversos protocolos e relataram o emprego de um grande número de suportes naturais ou sintéticos, de diferentes formas e tamanhos, porosos e não-porosos, e apresentando diferentes graus de hidrofiliicidade na adsorção de lipases.

Entre os suportes mais utilizados estão a alumina, sílica, celite, cerâmica, CaCO_3 , óxidos metálicos, vidros porosos, polipropileno, amberlite, sepharose, sephadex, celulose, zeólitas e outros (FORESTI e FERREIRA, 2007; KNÈZEVIC, MOJOVIC e ADNADJEVIC, 1998; ROSU *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2007).

Ghamgui *et al.* (2007) imobilizaram lipase produzida por *Rhizopus orizae* por meio de adsorção física em CaCO_3 , com rendimento de 95%. Os autores relataram que a atividade hidrolítica sobre o óleo de oliva e a síntese do éster etil oleato foi aumentada em relação à enzima livre.

A adsorção de lipases de *Candida cylindracea* (atual *C. rugosa*) em Nylon 6 foi estudada por Carta, Gainer e Benton (1991). Neste estudo, os autores utilizaram este sistema para a síntese de ésteres derivados do ácido propiônico em n-hexano, com obtenção de altos rendimentos. Serri, Kamaruddin e Long (2006) utilizaram lipase de *C. rugosa* imobilizada em Amberlite MB-1 na síntese do laurato de citronelil a partir de ácido láurico e citronelol em isooctano, com conversão em ésteres de 89%.

A adição de solventes e outros aditivos no processo de adsorção também têm sido explorados. Um exemplo é a adição de solventes polares capazes de “absorver” as moléculas de água do suporte, favorecendo a imobilização de lipases. Chang *et al.* (2007) estudaram as condições ótimas de imobilização de lipases de *C. rugosa* em celite, com rendimento de 34,1% de atividade a partir de um protocolo que inclui a adição de acetona gelada durante o processo.

Palomo *et al.* (2002) estudaram diversos materiais altamente hidrofóbicos, como octil-agarose e octadecil-Sepabeads, para a imobilização de lipases e obtiveram aumento da atividade e enantiosseletividade quando comparado às enzimas livres. Um outro exemplo de imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é o estudo realizado por Batisda *et al.* (1998) no qual a lipase de *Humicola lanuginosa* teve sua atividade aumentada em vinte vezes após adsorção em octil-agarose, e lipase de *Pseudomonas fluorescens* teve sua enantiosseletividade melhorada no mesmo suporte.

2.3.2 Imobilização de Lipases por Ligação Covalente

As lipases têm sido covalentemente imobilizadas em inúmeros suportes orgânicos e inorgânicos, como alumina, óxidos metálicos, aço inoxidável, vidros de porosidade controlada, celulose, amido, quitina, membranas de nylon e outros polímeros sintéticos (BRUNO *et al.*, 2004; KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

Lipases de *Pseudomonas fluorescens*, enzimas capazes de formar agregados bimoleculares, foram imobilizados por Palomo *et al.* (2004) por ligações multipontuais em glioxil-agarose na presença de Triton X-100 como agente protetor do sítio ativo enzimático. Este imobilizado foi utilizado na purificação de lipases de *Bacillus thermocatenulatus* clonados em *Escherichia coli* por interações lipase-lipase, que são facilmente dessorvidas na presença de surfactante.

Chaubey *et al.* (2006) imobilizaram lipase de *Arthrobacter* sp. por meio de ligações covalentes em CNBr-Sepharose e sílica gel silanizada com aminopropiltriethoxi silano, com aumento da enantiosseletividade e estabilidade durante a resolução de misturas racêmicas de drogas e seus intermediários.

Palomo *et al.* (2003) imobilizaram uma lipase produzida por *Mucor mihei* em diferentes resina epóxi funcionalizadas com diferentes grupos – epóxi-iminodiacético-Sepabeads, epóxi-etilenodiamino-Sepabeads e quelatos de epóxi-cobre-Sepabeads, e utilizadas na resolução de do ácido (R,S)-2-butil-2-fenilacético, com predominância do enantiômero S para os três suportes.

Tan *et al.* (2002) obtiveram monoglicerídeos a partir da hidrólise do óleo da palma com lipases imobilizadas em membranas de quitosana, álcool polivinílico e a combinação dos dois compostos, utilizando glutaraldeído ou epícloridina como agente formador de ligações cruzadas. Lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada na mistura quitosana-álcool polivinílico apresentou melhor atividade hidrolítica, com rendimento de 52%.

2.3.3 Imobilização de Lipases por Aprisionamento

A utilização de agentes gelificantes naturais de origem protéica ou polissacarídica - como gelatina, colágeno, ovoalbumina, caseinato, pectina, alginatos, dextrinas, amido, agarose e carragenanas, tem sido testadas para a formação de hidrogéis e retenção de lipases, com aumento da biocompatibilidade entre suporte e catalisador e criando um microambiente favorável para atividade enzimática (KENNEDY e WHITE, 1985; KNÈZEVIC, SILER-MARINKOVIC e MOJOVIC, 2004).

As vantagens apontadas para o uso destes materiais são a atoxicidade, baixo custo e biodegradabilidade (SEBRÃO *et al.*, 2007), o que favorece sua aplicação em processos que envolvam alimentos.

Um gel formado pela mistura do polissacarídeo alginato de sódio e gelatina foi utilizado na imobilização de lipases de pâncreas de porco, *Pseudomonas cepacia* e *Candida rugosa* por Fadnavis *et al.* (2003). O glutaraldeído foi adicionado para formação de *crosslinks* intramoleculares, com obtenção de um imobilizado estável após várias reutilizações.

Sebrão *et al.* (2007) imobilizaram lipases de diferentes fontes (*Pseudomonas sp*, *Rhizopus orizae*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger* e *Candida rugosa*) em filme de caseinato de sódio/ glicerol que foram utilizadas na síntese de ésteres a partir de ácidos alifáticos e alcoóis em meio orgânico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo estudar a imobilização de lipases extracelulares produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* em sílica gel.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar cepas de *Beauveria bassiana* produtoras de lipase;
- Selecionar suportes e técnicas para imobilização de lipase;
- Comparar as propriedades cinéticas e condições de estabilidade de lipase livre e lipase imobilizada em sílica gel;
- Avaliar o efeito do NaCl e Triton X-100 sobre a dessorção de lipase imobilizada em sílica gel;
- Avaliar a estabilidade operacional de lipase imobilizada em sílica gel em síntese orgânica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DO INÓCULO

Oito diferentes cepas de *B. bassiana* - CG481, CG432, CG71, CG152, Unioeste 4, Unioeste 40, Bbio44 e Bbio61, isolados de diferentes hospedeiros e regiões do país foram utilizados como inóculo e avaliados quanto à produção de lipases por meio de cultivos submersos. Os microrganismos foram cedidos pelo Banco de Entomopatógenos do Laboratório de Controle Microbiano de Insetos, da Universidade de Londrina e pelo Instituto Biológico de São Paulo.

Os isolados estocados a -20°C foram inicialmente repicados em meio de cultura sólido de ALVES (1998) com algumas modificações, sendo constituído por D-glucose anidra 1,0%, extrato de levedura 0,5%, NaNO₃ 0,16%, Na₂HPO₄.7H₂O 0,11%, KCl 0,1%, MgSO₄.7H₂O 0,06%, KH₂PO₄ 0,036% e ágar 2,0%. As placas foram incubadas por 14 dias em câmara BOD a 27±1°C, fotoperíodo de 12 horas e umidade a 70±5%. Os conídios obtidos foram utilizados para preparar suspensões de 10⁸ conídios/mL em água destilada contendo Triton X-100 0,1% como dispersante. Foi adicionado 1% (v/v) desta suspensão em todos os cultivos submersos, resultando no inóculo de 10⁶ conídios por mL de meio de cultura.

4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARO DA AMOSTRA

Lipases extracelulares foram produzidas por meio de cultivos submersos contendo saís de Vogel (1956), uréia 1,5%, CaCl₂ 0,1%, triton X-100 0,1%(v/v) e óleo de oliva 1%(v/v), utilizado como agente indutor. Alíquotas de 25 mL de meio foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e os cultivos foram conduzidos a 28°C, 200 rpm, durante 4 dias (CRUZ *et al.*, 2010). Cada cultivo foi acompanhado de um frasco controle sem adição do inóculo (Figura 9).

A interrupção do cultivo foi realizada por meio de filtração a vácuo sob banho de gelo, seguido de centrifugação a 4°C, 8000 xg, por 20 minutos. O extrato bruto contendo lipases foi dialisado contra tampão fosfato 5 mM pH 7,0, por 24 horas a 4°C.

Para os estudos envolvendo a imobilização de lipase foram realizados quatro cultivos de *B. bassiana* CG481 com vinte a quatro repetições cada. Os extratos brutos obtidos foram reunidos e parcialmente purificados através de ultrafiltração em membrana de 100kDa (Millipore), com concentração do volume em três vezes, e denominado extrato de lipase livre

(FL). FL foi utilizado para os ensaios de imobilização, caracterização das propriedades cinéticas e determinação das condições de estabilidade das lipases livres e imobilizadas.

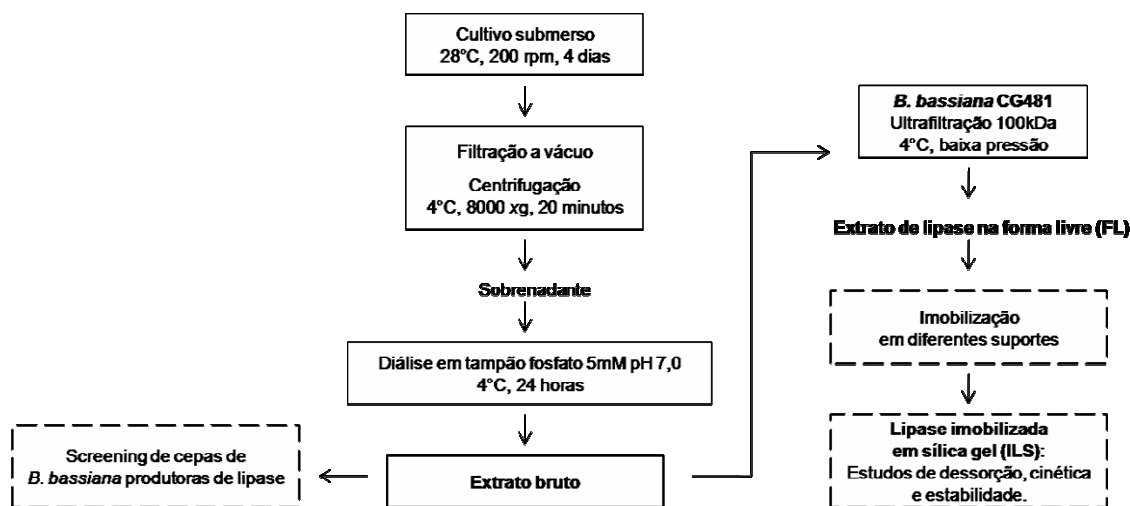


Figura 9- Fluxograma para produção e tratamento dos extratos de lipases produzidos por *B. bassiana*. FL - lipase na forma livre; ILS - lipases imobilizadas em sílica gel.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A atividade lipolítica foi determinada pela hidrólise do óleo de oliva, a 5% (v/v) sob a forma de emulsão em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 8,5 contendo sais de NaCl 5 mM e CaCl_2 5 mM como estabilizadores de reação (BROCKERHOFF e JENSEN, 1974), contendo PVA 2% (m/v) como agente emulsificante (WATANABE *et al.*, 1977). Esta emulsão foi preparada pela agitação a 200 rpm por 1 min. A reação foi iniciada com adição de 1 mL de lipase na forma livre (FL) ou 50 mg de lipase na forma imobilizada, totalizando um volume final de 20 mL. Esta mistura foi incubada a 37°C e sob agitação a 200 rpm por 2 horas. A reação foi interrompida pela adição de 20 mL da solução acetona/etanol 1:1 (v/v) e os ácidos graxos liberados pela ação de lipases foram titulados com NaOH 0,01 M utilizando timolftaleína 0,1 g% como indicador. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e os brancos reacionais foram preparados colocando a amostra após o período de incubação, seguida pela adição imediata da solução acetona/etanol. Uma unidade de atividade (U) foi

definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μmol de ácidos graxos livres por hora de reação.

4.4 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

A reação de esterificação foi empregada para verificação da atividade de lipase de *B. bassiana* em meio orgânico.

Os ensaios foram realizados em frascos cônicos com tampa com adição de 50 mg de lipase imobilizada em uma mistura contendo 0,1 M de ácido oléico e 0,1 M de 1-butanol preparados em n-heptano, contendo volume final de 5 mL e conduzidos a 37°C, 200 rpm, durante 24 h. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de acetona:etanol (1:1) e o imobilizado foi separado por centrifugação a 8000g durante 10 min. O ácido oléico residual foi titulado no sobrenadante com NaOH 0,01 M utilizando timolftaleína 0,1 g% como indicador. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os brancos reacionais foram preparados colocando a amostra após o período de incubação, seguida pela adição imediata da solução acetona/etanol (GHAMGUI *et al.*, 2007). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para o consumo de 1 μmol de ácido oléico por hora de reação.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

O teor de proteínas foi quantificado pelo método de Bradford (1976), utilizando solução padrão de albumina bovina 250 $\mu\text{g/mL}$, na faixa de concentração de 2,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$.

Para os experimentos envolvendo lipase imobilizada, a retenção de proteínas (RP) imobilizadas foi determinada pela diferença entre a quantidade inicial de proteínas introduzidas no processo de imobilização e a remanescente no filtrado e água de lavagem.

4.6 SELEÇÃO DE SUPORTE E TÉCNICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *B. bassiana*

Diferentes suportes e técnicas foram estudados para imobilização de FL e estão apresentados na Tabela 1. Exceto para a imobilização via aprisionamento em gel, 20 mL de FL (contendo 54,2 U/mL e 0,35 mg/mL de proteínas totais) e 10 mL de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 foram adicionados a 1 g de cada tipo de suporte, mantidos sob agitação 200 rpm em copo béquer de 100 mL a 25°C, por 1 hora.

Os suportes contendo lipase imobilizada foram lavados duas vezes com 5,0 mL do mesmo tampão, separados por filtração a vácuo, secos em dessecador a 25°C e estocados a -20°C até o momento do uso.

4.6.1 Adsorção

Foram empregados os suportes inorgânicos - sílica gel, celite 545, CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e Al_2O_3 para a imobilização de lipase de *B. bassiana* pelo método de adsorção. Após os primeiros 30 min de incubação, realizou-se uma etapa adicional de precipitação com acetona gelada a 50% (v/v), e mantidos por mais 30 min de agitação.

4.6.2 Ligação Iônica

As resinas Dowex (catiônica) e Amberlite MB-1 (catiônica-aniônica) foram pré-equilibradas *overnight* em tampão fosfato 50mM pH 7,0 e empregadas na imobilização FL. Estes mesmos suportes foram testados após pré-ativação em metanol (2 horas, 200 rpm, lavados 2x com tampão fosfato 50mM pH 7,0).

4.6.3 Ligação Covalente

Dowex e Amberlite MB-1 também foram utilizadas para imobilização covalente de lipase com adição de glutaraldeído 2,5% (v/v). Os suportes foram colocados em contato com glutaraldeído por 1 hora, sob agitação a 200 rpm, previamente ao contato com FL.

4.6.4 Aprisionamento em Gel

FL foi imobilizada por confinamento em gel de alginato de sódio 2% (m/v) em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,0. Após adição de 10 mL de FL (30 min, 200 rpm) a 40 mL de alginato de sódio 2%, esta mistura foi gotejada em uma solução de CaCl_2 2% a 4°C, com obtenção das esfera de alginato de cálcio, e mantidas a 4°C até o momento do uso.

O gel de alginato de sódio-gelatina foi preparado em tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,0 aquecido contendo alginato de sódio 5% (p/v) e gelatina 3% (p/v). Após resfriamento à temperatura ambiente, 10 mL de FL foram adicionados (30 min de agitação) a 90 mL da solução alginato/gelatina, seguido da adição de 3 mL glutaraldeído a 25% (30 min de

agitação). Esta mistura foi gotejada em uma solução de CaCl_2 2% a 4°C com formação das esferas de alginato/gelatina, e mantidas a 4°C até o momento do uso.

Tabela 1 – Suportes e técnicas utilizados para imobilização de lipase de *B. bassiana*.

Interação	Suporte	Referência
Adsorção em suporte inorgânico	Celite	Chang <i>et al.</i> , 2007; Castro <i>et al.</i> , 1999
	CaCO_3	Rosu <i>et al.</i> , 1997
	Silica gel	Minovska, Winkelhausen e Kuzmanova, 2005
	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Rosu <i>et al.</i> , 1997
	Al_2O_3	Rosu <i>et al.</i> , 1997
Ligação Iônica	Amberlite MB-1	Serri, Kamaruddin e Long, 2006
	Amberlite MB-1 tratado com metanol	Nieto, 2005; Takaç e Bakkal, 2007
	Dowex	Minovska, Winkelhausen e Kuzmanova, 2005
	Dowex tratado com metanol	Dalla-Vechia, Nascimento e Soldi, 2004
Ligação Covalente	Amberlite + glutaraldeído	Anita; Sastry; Hashim, 1997
	Dowex + glutaraldeído	Platková <i>et al.</i> , 2006
Aprisionamento em gel	Alginato de sódio	Betigeri e Neau, 2002
	Alginato de sódio e gelatina	Fadnavis <i>et al.</i> , 2003
	+ glutaraldeído (<i>crosslink</i>)	

4.6.5 Cálculo dos Parâmetros da Imobilização

A partir dos resultados experimentais os parâmetros do processo de imobilização - rendimento (Y) e retenção protéica (PR) foram calculados a partir das fórmulas:

$$Y = \frac{A_o \cdot 100}{A_t} \quad PR = \left(1 - \frac{P_o}{P_i}\right) \cdot 100$$

Sendo:

Y : rendimento do processo de imobilização (%), avaliada pelo método titulométrico sobre o óleo de oliva;

A_o : atividade observada do imobilizado (U);

A_t : atividade teórica do imobilizado (U);

PR : retenção protéica, avaliada no sobrenadante da imobilização (%);

P_o : teor de proteínas observada no sobrenadante (μg);

P_i : teor de proteínas inicial (μg).

4.7 ESTUDOS CINÉTICOS E DE ESTABILIDADE DE LIPASE DE *B. bassiana* ADSORVIDAS EM SÍLICA GEL

Lipase adsorvida em sílica gel foi selecionada para os estudos das propriedades cinéticas e de estabilidade de lipase imobilizada.

4.7.1 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Atividade de Lipases nas Formas Livre e Imobilizada

O efeito do pH e da temperatura sobre a atividade de FL e ILS (lipase imobilizada em sílica gel) foi investigado pelo método lipolítico, na faixa de pH entre 3 a 10 - tampão acetato de sódio 50 mM (pH 3-5), tampão maleato 50 mM (pH 6), tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 7-9) e tampão glicina-NaOH 50 mM (pH 10) a 37°C, e faixa de temperatura entre 20 e 60°C em pH 8,5.

4.7.2 Efeito do pH e Temperatura Sobre a Estabilidade de Lipases nas Formas Livre e Imobilizada

O efeito do pH sobre a estabilidade de FL e ILS foi examinado após pré-incubação das enzimas a 25°C por 24, 72 e 120 horas na faixa de pH de 6 a 9. A termoestabilidade foi investigada pela incubação das enzimas em temperaturas de 30, 40, 50 e 60°C por 1 hora, em pH 8,5, em meio aquoso (TRIS-HCl) e solvente orgânico (n-heptano, somente para ILS). As enzimas sem tratamentos foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% da atividade. A atividade residual foi determinada pelo método lipolítico.

4.7.3 Estabilidade Operacional de Lipase Adsorvida em Sílica gel

0,2 g de ILS foram testados para estabilidade operacional em sucessivos ciclos de esterificação segundo item 4.4, com duração de 24 h cada. Após cada ciclo, ILS foi lavado com n-heptano, separado por centrifugação a 8000 xg por 10 min e reutilizado para novo ciclo de reação.

4.8 EFEITO DO NaCl E TRITON X-100 SOBRE A DESSORÇÃO DE LIPASE DE *B. bassiana* ADSORVIDA EM SÍLICA GEL

Para o estudo de dessorção, 0,1 g de ILS foi mantido sobre agitação a 200 rpm em 20 mL de tampão fosfato 0,8M pH 7,0, NaCl 0,8 M ou Triton X-100 0,1% (v/v). Após 30 e 60 min de agitação a suspensão foi centrifugada a 8000 xg durante 15 min e o precipitado foi utilizado para medida da atividade lipolítica segundo 4.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussões estão apresentados na forma de artigo segundo as normas do periódico *Enzyme and Microbial Technology*, intitulado “Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption” e que consta no Anexo deste trabalho.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram obter as seguintes conclusões:

- Entre as oito cepas avaliadas, *Beauveria bassiana* CG481 apresentou maior produção de lipase extracelular, com atividade hidrolítica sobre o óleo de oliva de 30,5 U/mL;
- Sílica gel foi o melhor suporte para imobilização de lipase de *B. bassiana*, com rendimento para atividade lipolítica de 94,8%;
- Lipase de *B. bassiana* adsorvidas em sílica gel mantiveram as condições ótimas de pH (8,5) e temperatura (45°C) para a atividade de hidrólise do óleo de oliva, com melhora da atividade em valores mais elevados de pH (9,0 - 10,5) e temperatura (60°C), em relação a lipases livres;
- A imobilização de lipase de *B. bassiana* em sílica gel aumentou a estabilidade destas enzimas quando incubadas em pH 7,0 por até 120 horas, e sob tratamento térmico em diferentes temperaturas (30 a 60°C), durante 1 hora, em meio aquoso e em solvente orgânico;
- Lipase de *B. bassiana* adsorvida em sílica gel manteve 80,8% da atividade inicial após quatro ciclos de esterificação.

O estudo envolvendo imobilização de lipase produzidas por *B. bassiana* é inédito e os resultados obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas para catálise industrial destas enzimas. É necessário, no entanto, a continuidade dos estudos para otimização das condições de imobilização e emprego de novos suportes voltados para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.589-595, 2003.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle Microbiano de Insetos**. 2ª ed. Piracicaba: Fealq, 1998, cap.11.

ANITA, A.; SASTRY, C.A.; HASHIM, M.A. Immobilization of urease using Amberlite MB-1. **Bioprocess Engineering**, v.17, p.355-359, 1997.

BALCÃO, V.M.; PAIVA, A.L.; MALCATA, F.X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, n.6, p.392-416, 1996.

BAJPAI, P. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. **Biotechnology Progress**, v.15, n.2, p.147-157, 1999.

BATISDA, A.; SABUQUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISÁN, J.M. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n.5, p.486-493, 1998.

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

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1679-1684, 1987.

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

BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A.M.; DEREWENDA, Z.S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J.P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; NORSKOV, L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v.343, p.767-770, 1990.

BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G. **Lipolytic Enzymes**. Nova Iorque: Ed. Academic Press, 1974, 330 p.

BRUNO, L.M.; PINTO, G.A.S.; CASTRO, H.F.; LIMA-FILHO, J.L.; MELO, E.H.M. Variables that effect immobilization of *Mucor miehei* lipase on nylon membrane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p.371-375, 2004.

CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.145-154, 2001.

- CARTA, G.; GAINER, J.L.; BENTON, A.H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.1004-1009, 1991.
- CARVALHO, P.O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados. Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biociência e Desenvolvimento**, n.36, p.48-57, 2006.
- CASTRO, H.F.; OLIVEIRA, P.C.; SOARES, C.M.F.; ZANIN, G.M. Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n.1, p.147-152, 1999.
- CHANG, S.F.; CHANG, S.W.; YEN, Y.H; SHIEH, C.J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on celite by RSM. **Applied Clay Science**, v. 37, p.67-73, 2007.
- CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S.C.; QAZI, G.N. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p.598-606, 2006.
- CHEETAM, P.S.J. Principles of industrial enzymology: Basis of utilization of soluble and immobilized enzymes in industrial process. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2^a ed. Inglaterra: Ellis Horwood Limited. 1985, cap. 3.
- COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CRUZ, M.C.B. **Produção de lipases por fermentação submersa suplementada com óleos vegetais e resíduo agroindustrial pelo fungo *Beauveria bassiana***. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – Paraná.
- DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n.4, p.623-630, 2004.
- DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v.48, p.270-282, 2010.
- FADNAVIS, N. W.; SHEELU, G.; KUMAR, B.M.; BHALERAO, M.U.; DESHPANDE, A.A. Gelatin Blends with Alginate: Gels for Lipase Immobilization and Purification. **Biotechnology Progress**, v. 19, p.557-564, 2003.
- FERNANDEZ-LAFUENTE; R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.93, p.185-197, 1998.

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

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

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

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Analysis of the interaction of lipases with polypropylene of different structure and polypropylene-modified glass surface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 294, p. 147-155, 2007.

GANDHI, N.N. Applications of Lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.74, p.621-634, 1997.

GHAMGUI, H.; MILED, N.; KARRA-CHAÂBOUNI, M.; GARGOURI, Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus orizae* lipase onto CaCO_3 : A comparative study. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.34-31, 2007.

GILLESPIE, A.T. Use of fungi to control pests of agricultural importance. In: BURGE, M.N. (Ed.) **Fungi in biological control systems**. Nova Iorque : Manchester University Press, 1988, cap. 3.

GIORNO, L.; D'AMORE, E.; DRIOLI, E.; CASSANO, R.; PICCI, N. Influence of -OR ester group length on the catalytic activity and enantioselectivity of free lipase and immobilized in membrane used for the kinetic resolution of naproxen esters. **Journal of Catalysis**, v. 247, p.194-200, 2007.

GULATI, R.; ISAR, J.; KUMAR, V.; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S.; SAXENA, R.K. Production of a novel alkaline lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, v.77, n.1, p.251-262, 2005.

GUPTA, N.; RATHI, P.; SINGH, R.; GOSWAMI, V.; GUPTA, E. Single-step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.65, p. 648-653, 2005.

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

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

HEALTH CANADA. **Consultation document on *Beauveria bassiana* strain GHA. Proposed Registration Decision PRD 2009-03**. Disponível em <<http://www.hc-sc.gc.ca>>. Acesso em 03/03/2010.

HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria Bassiana*. **Biotechnology Letters**, v.10, n.9, 637-642, 1988.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v.53, p.315-351, 1999.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K.E.; RANSAC, S.; DIJKSTRA, B.W.; COLSON, C.; HEUVEL, M.; MISSET, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.15, p.29-63, 1994.

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

KENNEDY, J.F.; WHITE, C.A. Principles of immobilization of enzymes. In: WISEMAN, A. (Ed.) **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2^a ed. Inglaterra: Ellis Horwood Limited. 1985, cap. 4.

KNÈZEVIC, Z. D.; SILER-MARINKOVIC, S. S.; MOJOVIC, L. V. Immobilized lipase as practical catalysts. **APTEFF**, v. 35, p. 151-164, 2004.

LEE, D.H.; KIM, J.M.; KANG, S.W.; LEE, J.W.; KIM, S.W. Pretreatment of lipase with soybean oil before immobilization to prevent loss of activity. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1965-1969, 2006.

LIU, Y.Y.; XU, J.H.; WU, H.Y.; SHEN, D. Integration of purification with immobilization of *Candida rugosa* lipase for kinetic resolution of racemic ketoprofen. **Journal of Biotechnology**, v.110, p.209-217, 2004.

MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.D. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v.3, p.193-217, 1985.

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

MALCATA, F.H.; REYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fat and oils – A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.67, n.12, p.890-909, 1990.

MENDES, A.A.; CASTRO, H.F.; PEREIRA, E.B.; FURIGO JR, A. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v.28, n.2, p.296-305, 2005.

MESSING, R.A. (Ed.). **Immobilized enzyme in industrial reactors**. Nova Iorque, Estados Unidos: Academic Press, 1975.

MINOVSKA, V.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Lipase Immobilized by Different Techniques on Various Support Materials Applied in Oil Hydrolysis. **Journal of Serbian Chemical Society**, v. 70, n.4, p. 609-624, 2005.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of Fungi**. 3^a. ed. New Jersey: Practice-Hall Inc, cap. 12, 1990.

NELSON, J.M.; GRIFFIN, E.G. Adsorption of invertase. **Journal of American Chemical Society**, v.38, p.1109,1916.

NICOLIC, M.P.; SRDIC, V.V.; ANTOV, M. Immobilization of lipase into silica particles by physical adsorption. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.27, n.4, p.254-262, 2009.

NIETO, I.; ROCCHIETTI, S.; UBIALI, D.; SPERANZA, G.; MORELLI, C.F.; FUENTES, I.E.; ALCANTARA, A.R.; TERRENI, M. Immobilization of different protein fractions from *Rhizomucor mieheii* lipase crude extract. Enzymatic resolution of (R,S)-2-tetralol. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.514–520, 2005.

NOUREDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v.96, p.769-777, 2005.

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

PALOMO, J.M.; MUÑOZ, G.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FUENTES, M.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modulation of *Mucor miehei* lipase properties via directed immobilization on different hetero-functional epoxy resins: Hydrolytic resolution of (R,S)-2-butyryl-2-phenylacetic acid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.21, n.4, p.201-210, 2003.

PALOMO, J.M.; ORTIZ, C. FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of Chromatography A**, v.1038, p.267-273, 2004.

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

PILISSÃO, C. **Aminólise enantiosseletiva do (R,S)-mandelato de metila e síntese do acetato de geranoila mediada por lipases**. 2006. 88f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

PLATKOVÁ, Z.; POLAKOVIC, M.; STEFUCA, V.; VANDÁKOVÁ, M.; ANTOSOVÁ, M. Selection of Carrier for Immobilization of Fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*. **Chemicals Papers**, v. 60, n.6, p.469-472, 2006.

ROSU, R.; UOZAKI, Y.; IWAZAKI, Y.; YAMANE, T. Repeated Use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n.4, p.445-450, 1997.

ROSU, R.; UOZAKI, Y.; IWAZAKI, Y.; YAMANE, T. Intensification of lipase performance in a transesterification reaction by immobilization on CaCO_3 powder. **Journal Of Biotechnology**, v. 66, p.51-59, 1998.

SALAH, R.B.; GHAMGUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.103, n.4, p.368-372, 2007.

SAMSINAKOVA, A.; MISIKOVA, S.; LEOPOLD, J. Action of enzymatic systems of *Beauveria bassiana* on the cuticle of the greater wax moth larvae (*Galleria mellonella*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.18, p.322-330, 1971.

SANTOS, R. **Imobilização de lipases em gel de pectina**. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado Interinstitucional em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2003.

SARDA, L.E.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres em emulsion. **Bioquímica at Biophysica Acta**, v.30, p.513-521, 1958.

SEBRÃO, D.; SILVA, V.D.; NASCIMENTO, M.G.; MOREIRA, M.A. Imobilização de Lipases em Filme de Caseinato de Sódio/Glicerol: Aplicação na Síntese de Ésteres. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1182-1187, 2007.

SERRI, N.A.; KAMARUDDIN, A.H.; LONG, W.S. Studies of reaction parameters on synthesis of citronellyl laurate ester via *Candida rugosa* lipase in organic media. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, p.253-260, 2006

SCHMID, R.D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v.37, p.1608–1633, 1998.

SCHRADER, J.; ETSCHMANN, M.M.W; SELL, D.; HILMER, J.M.; RABENHORST, J. Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – current industrial processes and future prospects. **Biotechnology Letters**, v.26, p.463-472, 2004.

SEITZ, E. Industrial Application of Microbial Lipases: A Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.51, n.2, p.12-16, 2007.

SHIBATANI, T.; NAKAMICHI, K.; MATSUMAE, H. Method for preparing optically active 3-phenylglycidic acid esters. **European Patent Application**. EP362556, 1990.

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

St-LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, p. 167-177, 1986.

St-LEGER, R. J.; COOPER, R. M.; CHARNLEY, A. K. Cuticle-degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: Regulation of Production of Chitinolytic Enzymes. **Journal of General Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 1509-1517, 1986a.

TAN, T.; WANG, F.; ZHANG, H. Preparation of PVA/chitosan lipase membrane reactor and its application in synthesis of monoglyceride. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.18, p-325-331, 2002.

TAKAÇ, S.; BAKKAL, M. Impressive effect of immobilization conditions on the catalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward S-Naproxen production. **Process Biochemistry**, v. 42, p.1021–1027, 2007.

VARANASIA, A.; OBENDORFA, S.K.; PEDERSEN, L.S. MEJLDALB, R. Lipid distribution on textiles in relation to washing with lipases. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.4, n.2, p.135-146, 2001.

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

WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, p.1353-1358, 1977.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n.4, p. 355-360, 2000.

WINGARD, L.B.; KATCHALSKI-KATZIR, E.; GOLDSTAIN, L. (Ed.). **Applied Biochemistry and Bioengineering. Immobilized enzyme principles**. Nova Iorque, Estados Unidos: Academic Press, vol.1, 1976.

WINKLER, F.K.; D'ARCY, A.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, v.343, p.771-774, 1990.

WU, J.C.; LEE, S.S.; MAHMOOD, M.M.B.; CHOW, Y.; TAKUKDER, M.M.R.; CHOI, W.J. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n.45, p.108-112, 2007.

ZABORSKI, O. **Immobilized Enzymes**. Cleveland, Estados Unidos: CRC Press, 1973.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. ENZIMAS IMOBILIZADAS. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.) **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 1ªed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap. 4.

ANEXO

Artigo: “Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption”.

Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption

Vanessa Hitomi Sugahara, Geni da Silva Varéa

Biochemistry and Biotechnology Department, State University of Londrina (UEL)

PO Box 6001, zip code 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil

Abstract

Extracellular lipase from *Beauveria bassiana* strain CG481 was immobilized by using thirteen different immobilization protocols. Silica gel was chosen as the most suitable adsorbent with 94.8% of activity yield. The adsorption on silica gel did not change the optimum pH (8.5) and temperature (45°C) values of free lipase for lipolytic activity, and it showed higher activities in extreme conditions (pH 9.0 to 10.5, 60°C). The lipase immobilized on silica gel (ILS) showed enhanced stability at pH 7.0 after 120 h incubation of lipolytic activity (69.0%) when compared to free lipase (FL) (33.3%). The thermal stability was also enhanced by immobilization at 60°C in aqueous (64.6%) and organic medium (95.1%), while FL showed only 40.6% of residual activity in aqueous medium and exhibited no activity for esterification reaction in n-heptane. The treatment of ILS with 0.8 M NaCl prevent lipase desorption while Triton X-100 (0.1%) facilitate the enzyme leakage. The ILS was reused for four times for esterification reaction kept 80.8% of initial activity.

Key words: immobilization, lipase, *Beauveria bassiana*, silica gel.

Introduction

Enzyme immobilization offers numerous advantages as recovery of biocatalyst for reuse and enables its application in continuous process with separation of reaction products without enzyme contamination. Furthermore, immobilized enzymes generally show increased stability under operational condition, heat, organic solvent and extreme pH values [1-3].

The support for immobilization must be carefully selected because its characteristics (nature, reactive group and interaction forms with enzymes) can affect on enzyme activity [4].

Adsorption on solid supports is a simple and inexpensive method for enzyme immobilization and it is more suitable for use in organic solvents than aqueous solutions [5]. In this case, porous inorganic materials, like silica gel, have the advantage of large surface for enzyme retention addition to the protection of enzymes inside the pores [2].

Lipases (glycerol ester hydrolases, E.C.3.1.1.3) are considered the most promising group of biocatalysts due to ability to act in different types of reactions as hydrolysis, interesterification, esterification, alcoholysis, acidolysis and aminolysis [6]. Besides, they present a wide range of substrates and interesting properties as regio- and stereo- specificity, and chemoselectivity [7] that allow several applications covering the production of detergents, wastewater treatment, textile and leather tanning [7-8]. In addition, lipases on immobilized forms have been successfully applied in organic catalysis production of flavorings, pharmaceuticals and agrochemicals [9]. However, as with other enzymes used in industrial operations, the use of lipases can be limited by the high cost of production and purification, difficulties of enzyme recovery at the end of process and low enzyme stability [10] that can be solved by immobilization techniques.

Despite studies involving enzymes of entomopathogenic fungi are focused on biological control of insects, previous studies of Cruz *et al.* [11] showed good results for activity and stability of *B. bassiana* lipase, making it interesting for biotechnological applications. Furthermore, the use of entomopathogenic fungus *B. bassiana* has the advantage of being harmless to humans and animals and be easily found in the environment [12].

The present study evaluated different carriers and techniques for immobilization of extracellular lipase produced by *B. bassiana*, and studied the effect of adsorption on silica gel on enzyme activity and stability.

Materials and Methods

Materials

Silica gel (particle size 10 - 40 μ), celite 545, CaCO₃, Al₂O₃, CaSO₄.2H₂O, sodium alginate, gelatin, polyvinyl alcohol and bovine serum albumin were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, USA). Amberlite MB-1 was purchased from Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, USA). Dowex 50X8 was obtained from Dow Co. (Midland, USA). Olive oil (low acidity) was purchased commercially. All the other substances were of analytical grade.

Microorganisms

Were used eight *B. bassiana* strains: CG71, CG152, CG432, CG481, Unioeste4, Unioeste40, Bbio44 and Bbio61. All of them were isolated from different hosts and geographic regions of Brazil and were granted by Department of Agronomy of UEL and Biological Institute of São Paulo. The frozen spores (-20°C) were subcultured in solid medium containing 1.0% D-glucose, 0.5% yeast extract, 0.16% NaNO₃, 0.11% Na₂HPO₄·7H₂O, 0.1% KCl, 0.06% MgSO₄·7H₂O, 0.036% KH₂PO₄, 2.0% agar [13]. The plates were incubated for 14 days, 27±1°C, 12 h photoperiod and 70±5% of humidity.

Production and ultrafiltration of lipase

Extracellular lipase was obtained by submerged cultures in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of Vogel salts broth (1956) [14] added by 1% olive oil, 1.5% urea, 0.1% CaCl₂·2H₂O and 0.1% Triton X-100. All cultures were inoculated with 10⁶ spores/mL and performed at 28°C and 200 rpm (orbital shaker), during 4 days. The crude lipase extracts were obtained by centrifugation of the cultures (8000g, 4°C, during 15 min) and they were dialyzed against 5 mM phosphate buffer pH 7.0, at 4°C, during 24 h [11].

For immobilization studies four cultures of *B. bassiana* CG481 with twenty four repetitions each were performed. The lipase extracts were gathered and concentrated three times by ultrafiltration using membrane cut off 100kDa (Millipore) accomplished at Stirred cell (Sigma) at 4°C, and denominated free lipase (FL).

Screening of carriers for lipase immobilization

Thirteen different protocols for lipase immobilization were employed. Except for entrapment technique, 20 mL of FL (containing 54 U/mL lipase activity and 0.35 mg/mL protein) and 10 mL of 50 mM phosphate buffer pH 7.0 (immobilization buffer) was added to 1 g of each support. The immobilization was carried out into 100 mL glass vessel placed on a magnet stirring plate at 200 rpm and 25°C, during 1 h. The immobilized lipase was washed twice using the same immobilization buffer, separated by vacuum filtration, dry in desiccator at 25°C and stocked at -20°C.

Lipase immobilization by physical adsorption was carried by five inorganic carriers - Al_2O_3 , CaCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, celite 545 and silica gel, using the same technique described above, but modified by including 15 mL of acetone in the last 30 min of incubation.

The synthetic ion-exchange resins Amberlite MB-1 and Dowex were tested for ionic binding of lipase. The carriers were equilibrated overnight in 50 mM phosphate buffer pH 7.0 before contact with FL. The same supports were also tested with pretreatment with methanol (2 h, 200 rpm, washed two times with 50 mM phosphate buffer pH 7.0) before lipase addition. Amberlite MB-1 and Dowex were also used for covalent binding of lipases by addition of 2.5% glutaraldehyde in immobilization buffer (1 h, 200 rpm) prior to lipase contact with the carriers.

Lipase was immobilized by gel entrapment by two techniques. The first one used a mixture of 10 mL of FL and 40 mL of 2% sodium alginate in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 7.0. The second technique used 10 mL of FL and 90 mL of 5% sodium alginate and 3% gelatin blend in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 7.0 were mixed to 3 mL 25% glutaraldehyde. In both cases, after 30 min incubation at 200 rpm on a magnet stirring plate, the mixture was dripped with a pipette into a 2% CaCl_2 solution at 4°C. The gel beads formed were maintained into CaCl_2 solution until used.

Immobilization yield (Y) was evaluated by calculating the hydrolytic activity of lipase before and after immobilization, using the relation:

$$\text{Yield (\%)} = (\text{immobilized lipase activity} / \text{initial lipase activity}) \cdot 100$$

Protein retention (PR) was estimated indirectly by the difference between the amount of protein introduced for immobilization and the amount of protein in the filtrate and washing solution, and calculated as follows:

$$\text{Protein retention (\%)} = [1 - (\text{total protein on filtrate} / \text{total protein added})] \cdot 100$$

Lipolytic activity determination

Lipase activity was determined by titrimetric method [15] with some modifications. Emulsified substrate was prepared by agitation at 200 rpm, 1 min in 125 mL Erlenmeyer flasks, and it consisted of 5% olive oil, 2% polyvinyl alcohol (PVA) as emulsifier in 50 mM TRIS-HCl buffer pH 8.5 containing 50 mM NaCl and 5 mM CaCl_2 to obtain 20 mL final volume. The hydrolysis reaction was initiated by adding of 1 mL of FL or 50 mg of immobilized lipase and incubated at 37°C at 200 rpm in a orbital shaker during 2 h and was stopped by adding 20 mL acetone-ethanol (1:1). The amount of free fatty acid released during

hydrolysis was measured by titration with 0.010 N NaOH solution using thymolphthalein as indicator. One unit (U) of lipolytic activity was defined as the amount of enzymes that liberates one μmol free fatty acid from olive oil per hour under the assay conditions. All lipolytic assays were running in triplicate and with a parallel control without addition of enzyme under the same conditions.

Esterification reactions

Esterification reaction was carried out to verify the catalytic activity of immobilized lipases in organic medium and was performed in screw-capped flasks: 50 mg of lipase immobilized on silica gel were added to 5 ml of a mixture composed by 0.1 M oleic acid and 0.1 M 1-butanol in n-heptane, at 37°C 200 rpm during 24 h [16]. The reaction was stopped by adding 5 ml of acetone:ethanol (1:1) and immobilized enzyme was separated by centrifugation at 8000g for 10 min. The supernatant obtained was measured to residual oleic acid by titrimetric method. The tests were conducted in three replicates and the controls were run without the addition of enzyme under the same conditions. One unit (U) of esterification activity was defined as one μmol oleic acid consumed in the esterification reaction per hour under the assay conditions.

Protein estimation

Protein was estimated according to Bradford [17] method using bovine serum albumin as standard.

pH and temperature effects on lipase activity

Effects of pH and temperature on FL and lipase immobilized on silica gel (ILS) activities were tested using 50mM buffers at pH range from 3 to 10: sodium acetate buffer (pH 3, 4 and 5); maleate buffer (pH 6); TRIS-HCl buffer (pH 7, 8, 9); glycine-NaOH buffer (pH 10), and at temperatures 30, 40, 50 and 60°C, by lipolytic method.

pH and temperature effects on lipase stability

pH stability of FL and ILS was verified by measure of residual lipolytic activity after preincubation of samples at pH 6, 7, 8 and 9 for 24, 48, 72 and 120 h.

The thermal stability was tested at 30, 40, 50 and 60°C, for 1 h of incubation in aqueous medium (TRIS-HCl buffer pH 8.5) for FL and ILS, and organic medium (n-heptane) only for ILS. The residual activity was assayed by lipolytic and esterification methods, respectively. For all stability tests the untreated enzyme was taken as 100% activity control.

Effect of NaCl and Triton X-100 on ILS desorption

In order to investigate the nature of interaction between lipase and silica gel, 0.1 g ILS was stirred magnetically at 200 rpm in 20 mL 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 containing 0.8 M NaCl or 0.1% (v/v) Triton X-100. After 30 and 60 min the suspension was centrifuged at 8000g for 15 min and the precipitate was assayed for lipolytic activity.

Operational stability

0.2 g of ILS was assayed by successive batches of esterification reaction. After each cycle of 24 h, ILS was washed with n-heptane, separated by centrifugation at 8000g, for 10 min and reused in a fresh medium.

Results and Discussion

Lipase production

Among eight *B. bassiana* tested, the strain CG481 showed highest lipolytic activity (30.5 U/mL). This strain was selected as the best lipase producer and used for immobilization studies. CG71 and Bbio61 presented intermediary lipolytic activities of 16.8 U/mL and 15.5 U/mL, respectively, and the other strains, Bbio44, Unioeste40, CG432, CG152 and Unioeste4 exhibited lower lipolytic activities of 7.3, 2.0, 1.5; 1.2; 0.1 U/mL, respectively (Fig.1). Hegedus and Kachatourians (1988) [18] found an increase of lipase production by *B. bassiana* strain GK2116 in submerged cultivations in yeast-peptone-dextrose culture medium supplied with 5% olive oil. However, Cruz *et al.* (2010) [11] reached the optimal condition for *B. bassiana* CG432 lipase production in Vogel salt broth with 0.75% olive oil and without addition of carbon source (D-glucose), evaluated by response surface methodology.

Screening of supports for immobilization

In order to select a suitable support for lipase immobilization, thirteen immobilization protocols were tested, including adsorption, ionic and covalent binding, and gel entrapment mechanism. It was observed high protein retention (*PR*) among all the carriers used for lipase adsorption, but the lipolytic activity did not correspond to protein loading in the most of cases. Only immobilization on silica gel showed the highest immobilization yield (*Y*) of 94.8% while the others carriers presented yield lower than 50% (Table 1).

Mustaranta *et al.* [19] observed similar effect which the Celite-immobilized exhibited negligible activity despite the high protein retention. Minovska *et al.* [20] reported high performance for immobilization of *Candida rugosa* in $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (91%) because its fine powder structure with a wide adsorption area. Alloue *et al.* [21] reached good yield for *Yarrowia lipolytica* lipase adsorption on silica gel (43%) among five carriers tested.

Immobilization of *B. bassiana* lipase by ionic bonds showed very low *Y* (4.7%) and *PR* values (Table 1), but when previously treated with methanol, Amberlite MB-1 showed an increase from 2.6 times of yield (12.4%). Immobilization on Dowex presented no activity retention in both cases, without or with pretreatment with methanol, but the addition of glutaraldehyde to form covalent bridges between lipases and support favored the immobilization on the Dowex resin, showing (1.2%). In this case, immobilization on Amberlite MB-1 exhibited intermediate result of 8.0% or 1.7 times greater than the test without any treatment.

The entrapment of lipase on sodium alginate gel showed 100% value of *PR* but without activity detection (Table 1). One factor that may have influenced is the gel pore size, that hampers the substrate access to enzyme when the pore is reduced causing the diffusion effect. The porosity of these gels can be controlled by the concentration of alginate in the gel [22]. However, the addition of gelatin and glutaraldehyde that to form alginate-lipase and lipase-lipase bridges (crosslinks), favored the retention of lipase within the gel matrix (*Y*=29.8%) (Table 1).

As reported Fadnavis *et al.* [23] the electrostatic interaction between the carboxylic acid groups of alginate and gelatin amino groups allowed the formation of a resistant hydrogel.

Among the thirteen protocols tested, *B. bassiana* lipase adsorption on silica gel presented the best result of immobilization yield. This adsorbent is presented as a porous, inexpensive and sturdy support [2,24,25] and was selected it for kinetic and stability experiments.

Effect of pH and temperature on the activity of FL and ILS

The pH effect on FL and ILS activity was tested at 3 to 10. The optimum lipolytic activity was achieved at pH 8.5 both for FL and ILS, however, ILS showed higher activities at pHs 9.0, 9.5 and 10.0 compared to FL that showed sharp drop in lipolytic activity and it was not detect activity at pH 9.5 and 10.0 (Fig.2).

The temperature dependence of FL and ILS for the hydrolytic activity of lipases was evaluated in the range of 20°C to 60°C. Both lipases in immobilized and free forms showed maximum activity at 45°C. However, with increasing temperature, FL showed a tendency to rapid activity decrease, while immobilized lipase showed slower decrease of activity. At 60°C, FL showed only 59.29% of its optimum activity, while immobilized on silica remained 79.13% (Fig. 3). Similar results were obtained by Minovska *et al.* [19] for lipase from *Candida rugosa* immobilized on Amberlite IRC50, and Vemuri *et al.* [26] which immobilized lipase from *Pseudomonas* sp. on alginate gel. These results indicate stability improved by immobilization at higher pH and temperature. Probably, the interaction between lipase and silica gel delayed the enzyme denaturation showing greater activity in relation to the free enzyme [27]. Another possibility for increased immobilized in pH above the optimum value is the accumulation of negative charges on the surface of silica gel, with attraction of H⁺ ions near the support, making the apparently more acidic microenvironment [28].

Effect of pH and temperature on the stability of free and immobilized B. bassiana lipase on silica gel

It was observed a similar kinetic behavior to the stability of FL at different pH values tested (6 to 9) (Fig.4), presenting decrease of 50% or more of initial activity after 120 hours. Moreover, ILS showed increased stability when incubated at pH 7.0 in intervals of 72 hours (92.9%) up to 120 hours (69.0%) while FL held only 66.7% and 33.3% of activity (Fig.4) in the same period. At pH 6.0 and 8.0 FL and ILS stabilities were very similar. However, at pH 9.0 a significant decrease was observed in the stability of ILS.

Thermal stability is a very important feature for the industrial application of enzymes and the immobilization promotes, in most cases, a significant increase in this parameter [27]. In all temperatures examined the adsorption increased the thermal stability of ILS in aqueous and organic medium (Fig.5). At 60°C, FL retained only 40.6% of activity after 1 hour, while ILS retained 64.7% in aqueous medium and 95.1% in n-heptane. Moreover, at 30°C incubation in

n-heptane, ILS showed an increase of esterification activity to 173.2%. Lyophilized FL did not show esterification activity.

These results suggest that adsorption interactions between lipase and support promote enzyme thermal stability, preventing denaturation and changes in enzyme conformation in both aqueous and organic medium. The use of organic solvents as reaction media provides many attractive advantages for industrial process compared to traditional aqueous medium systems, such as increased solubility of hydrophobic substrates, often enhanced thermostability and elimination of microbial contamination [29].

Silica gel presents a pore size generally between 6 and 15 nm favoring the localization of lipase inside the silica gel micropores, since it has been described with size of 6.88 nm x 6.85 nm x 5.2 nm [30], and probably protected enzyme against microenvironment alterations.

Similar results was obtained by Nicolic *et al.* [2] after incubation of *C. rugosa* lipase at 50°C during 1 h, where the FL enzyme showed only 21% of initial lipase activity while the lipase immobilized on silica retained 84% in aqueous medium.

Besides, the addition of acetone during the immobilization may have promoted thermal stability to the enzyme, probably acting in the withdrawal of water around the enzyme molecule as reported by Wu *et al.* [5] for *Mucor javanicus* lipase immobilization on Amberlite XAD-7 by increase enzyme more rigid and resistant to thermo-deactivation.

Effect of NaCl and Triton X-100 on ILS desorption

After 30 min of incubation in phosphate buffer it was observed a 12.1% of lipolytic activity decrease. However, ILS treated with 0.8 M NaCl hampered lipase desorption with decrease of only 2.2% and 3.8% of lipolytic activity after 30 and 60 min. Otherwise, the presence of 0.1% Triton X-100 facilitated the lipase desorption with decrease of 33.7 and 37.0% of activity, after 30 and 60 min. These results agree with Nikolic *et al.* [2] which obtained similar results with *C. rugosa* lipase adsorbed on silica gel. The desorption prevention by NaCl is explained by the fact that sodium ions helps to reduce the negative charges of silica gel (isoelectric point 2,5), resulting in less repulsion between the molecule and the lipase carrier [31]. Triton X-100 acts the opposite manner improving desorption because of the competition with lipases for hydrophobic regions of silica gel [32]. These results suggest that the nature of adsorption of *B. bassiana* lipase on silica gel is hydrophobic probably by interfacial activation [7].

Operational stability

Adsorbed lipase shows a great reuse capacity in organic solvents because of the less leakage of enzyme from support [3,29]. Reuse of immobilized enzymes is a very important characteristic in industrial application due to the economic advantages. The operational stability can make the process feasible despite the high costs of production, purification and immobilization of enzymes [1]. The ILS could be reused up to four cycles with 80.8% of initial activity. However, after five cycles of esterification reaction the activity decreases to 53.8%. This reduction of activity probably occurred due to lipase desorption from silica gel during repeated use. Kumari et al. [3] reported 90% of activity retention after four cycles of isoamyl acetate synthesis by *Enterobacter aerogenes* lipase immobilized on silica gel by cross-link method.

Conclusions

Adsorption of *B. bassiana* CG481 lipase on silica gel enhanced the lipolytic activity at higher pH and temperature conditions, and showed improvement of stability on organic solvents. This is the first study involving the immobilization of lipase produced by *B. bassiana* which presents that advantage of being safe for human health. This research opens new perspectives for the use of *B. bassiana* lipase on industrial catalysis and further studies with other immobilization carriers.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial supports provided by CNPq - National Counsel of Technological and Scientific Development and the Department of Agronomy, UEL and Biological Institute of São Paulo for *B. bassiana* strains granted.

References

- [1] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Tech* 2007;40,1451-1463.

- [2] Nicolice MP, Srdic VV, Antov M. Immobilization of lipase into silica particles by physical adsorption. *Biocatal Biotransfor* 2009,27,254-262.
- [3] Kumari A, Mahapatra P, Kumar GV, Banerjee R. Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. *Bioproc Biosyst Eng* 2008,31,291-298.
- [4] Knezevic ZD, Siler-Marinkovic SS, Mojovic LV. Immobilized lipase as practical catalysts. *APTEFF* 2004,35,151-164.
- [5] Wu JC, Lee SS, Mahmood MMB, Chow Y, Takukder MMR, Choi WJ. Enhanced activity and stability of immobilized lipases by treatment with polar solvents prior to lyophilization. *J Mol Catal B-Enzym* 2007,45,108-112.
- [6] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Methods for detection and characterization of lipase: a comprehensive review. *Biotechnol Adv* 2009,27,782-798.
- [7] Fernandez-Lorente G, Cabrera Z, Godoy C, Fernanzen-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochem* 2008,43,1061-1067.
- [8] Castro-Ochoa LD, Rodríguez-Gómez C, Valerio-Alfaro G, Ros RO. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme Microb Tech* 2005,37,648-654.
- [9] Abbas H, Comeau L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp *Enzyme Microb Tech* 2003,32,589-595.
- [10] Chaubey A, Parshad R, Koul S, Taneja SC, Qazi GN. *Arthrobacter* sp. lipase immobilization for improvement in stability and enantioselectivity. *Appl Biochem Biotech* 2006,73,598-606.
- [11] Cruz MCB, Varéa GS, Miyagui DT, Sugahara VH, Borsato D. Simultaneous high lipase and biomass production in submerged fermentation of *Beauveria bassiana*. *Process Biochem* 2009 (in press).
- [12] Health Canada. Consultation document on *Beauveria bassiana* strain GHA, Proposed Registration Decision PRD 2009-03. www.hc-sc.gc.ca. Access 10 March, 2010.
- [13] Alves SB. Fungos entomopatogênicos. In: Controle microbiano de insetos 2^a ed., Piracicaba, SP, 1998, cap.11.
- [14] Vogel HJ. A convenient growth medium for *Newrospora crassa*. *Microbiol Gen Bull* 1956, 13,42-43.

- [15] Watanabe N, Ota Y, Minoda Y, Yamada K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agr Biol Chem* 1977,41,1353-1358.
- [16] Ghamgui H; Miled N, Karra-Chaâbouni M, Gargouri Y. Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized *Rhizopus orizae* lipase onto CaCO₃: A comparative study. *Biochem Eng J* 2007,37,34-31.
- [17] Bradford MMA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72, 248-254.
- [18] Hegedus DD, Khachatourians GG. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol Lett* 1988,10,637-642.
- [19] Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. Application of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microb Tech* 1993,15,133-139.
- [20] Minovska V, Winkelhausen E, Kuzmanova S. Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. *J Serb Chem Soc* 2005,70,609-624.
- [21] Alloue WAM, Destain J, Medjoub TE, Ghalfi H, Kabran P, Honart P. Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. *Appl Biochem Biotech* 2008,150, 51-63.
- [22] Won K, Kim S, Kim K, Park HW, Moon S. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads. *Process Biochem* 2005,40,2149-2154.
- [23] Fadnavis NW, Sheelu G, Kumar BM, Bhalerao MU, Deshpande AA. Gelatin blends with alginate: gels for lipase immobilization and purification. *Biotechnol Progr* 2003,19,557-564.
- [24] Cruz JC, Prfomm PH, Rezac ME. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on fumed silica. *Process Biochem* 2009,44, 62-69.
- [25] Christensen MW, Andersen L, Husum TL, Kirb O. Industrial lipase immobilization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 2003,105,318-312.
- [26] Vemuri G, Banerjee R, Bhattacharyya BC. Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: optimization of reaction conditions. *Bioprocess Eng* 1998,19,111-114.
- [27] Cao L. Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH, 2005, 588p.
- [28] Zanin GM, Moraes FF. Enzimas Imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Ed.) *Enzimas como agentes biotecnológicos*. 1ªed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004, cap. 4.

- [29] Doukyu N, Ogino H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem Eng J* 2010,48,270-282.
- [30] Ge J, Yan M, Lu D, Zhang M, Liu Z. Hyperbranched polymer conjugated lipase with enhanced activity and stability. *Biochem Eng J* 2007,36,93-99.
- [31] Tohver V, Smay JE, Braem A, Braun PV, Lewis JA. Nonoparticle halos: a new colloid stabilization mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98,8950-8954.
- [32] Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. *J Chromatography A* 2004,1038,267-273.

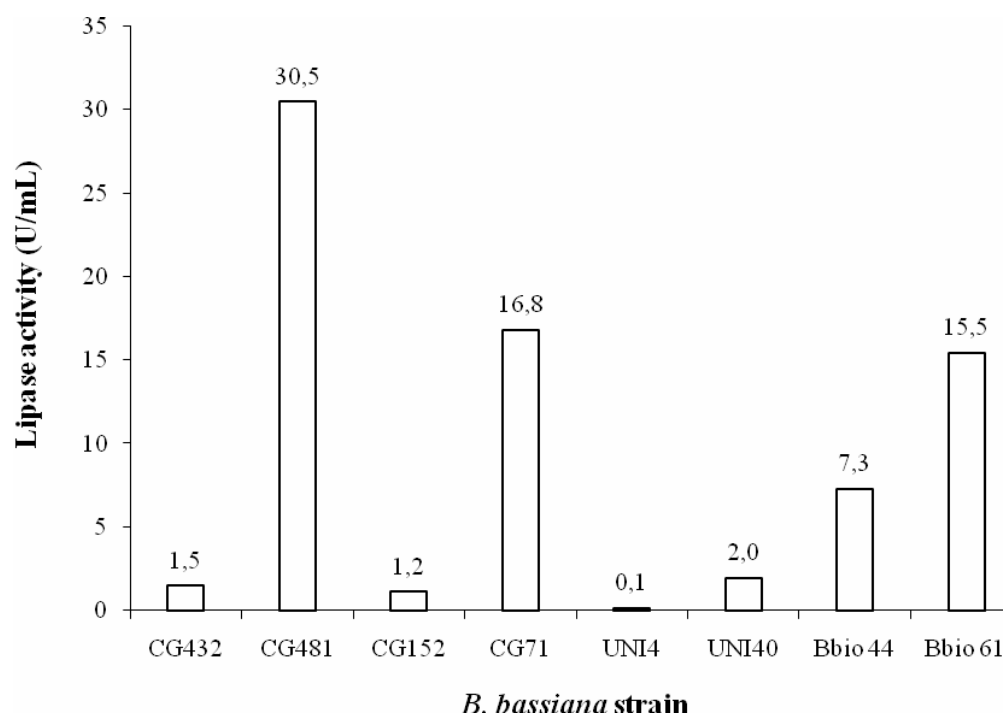


Figure 1. Production of extracellular lipase from *B. bassiana* by different strains in Vogel salt broth added by 1% olive oil, 1.5% urea, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% Triton X-100 during 4 days. Lipolytic activity measured by titrimetric method on olive oil substrate.

Table 1. Immobilization yield and protein retention of *Beauveria bassiana* CG 481 lipase on different types of carriers e interactions.

Interaction	Carrier	Immobilization yield (%)	Protein retention (%)
Adsorption on inorganic carrier	Al ₂ O ₃	0.6	95.1
	CaCO ₃	1.1	99.6
	CaSO ₄ .2H ₂ O	27.6	98.5
	Celite	0.0	62.7
	Silica gel	94.8	55.1
Ionic binding	Amberlite MB-1	4.7	54.2
	Dowex	0.0	40.6
	Amberlite treated by methanol	12.4	71.6
	Dowex treated by methanol	0.0	52.0
Covalent binding	Amberlite MB-1+ glutaraldehyde	8.0	79.1
	Dowex + glutaraldehyde	1.2	41.6
Entrapment	Sodium alginate	0.0	100.0
	Sodium alginate/ gelatin + glutaraldehyde	29.8	100.0

Immobilized lipase activity measured by titrimetric method on olive oil substrate. Protein determination by Bradford method.

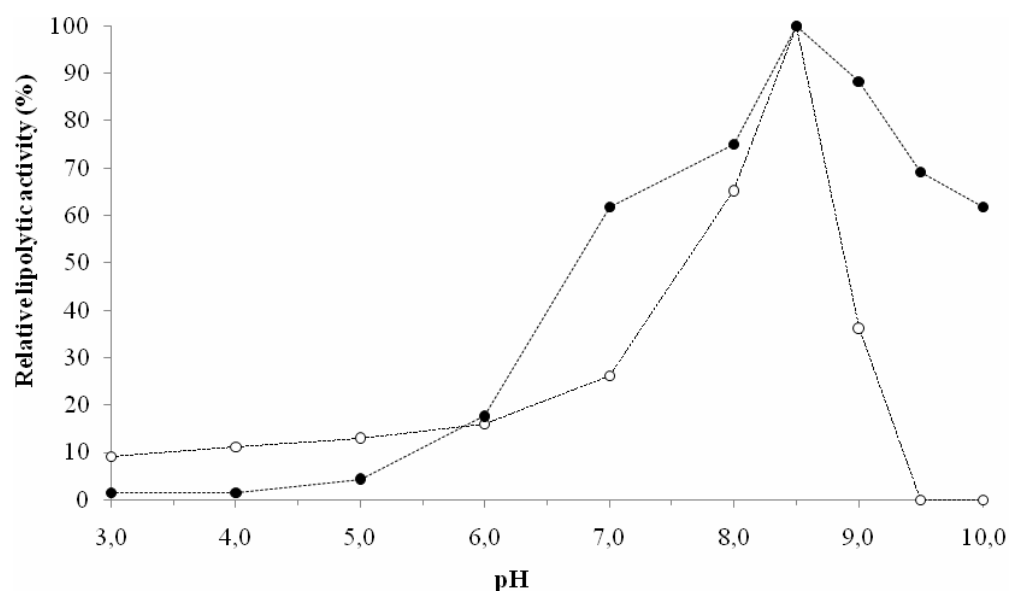


Figure 2. pH effect on free lipase FL (○) and silica gel immobilized lipase SIL (●) activity. Lipolytic activity measured by titrimetric method on olive oil substrate, at 37°C.

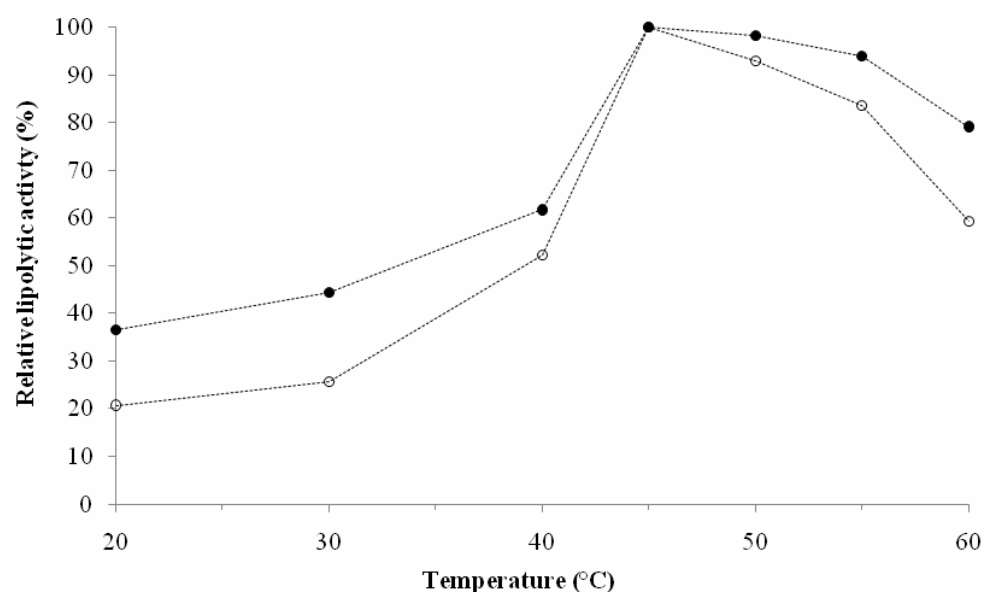


Figure 3. Temperature effect on FL (○) and SIL (●) activity. Lipolytic activity measured by titrimetric method on olive oil substrate, at pH 8,5.

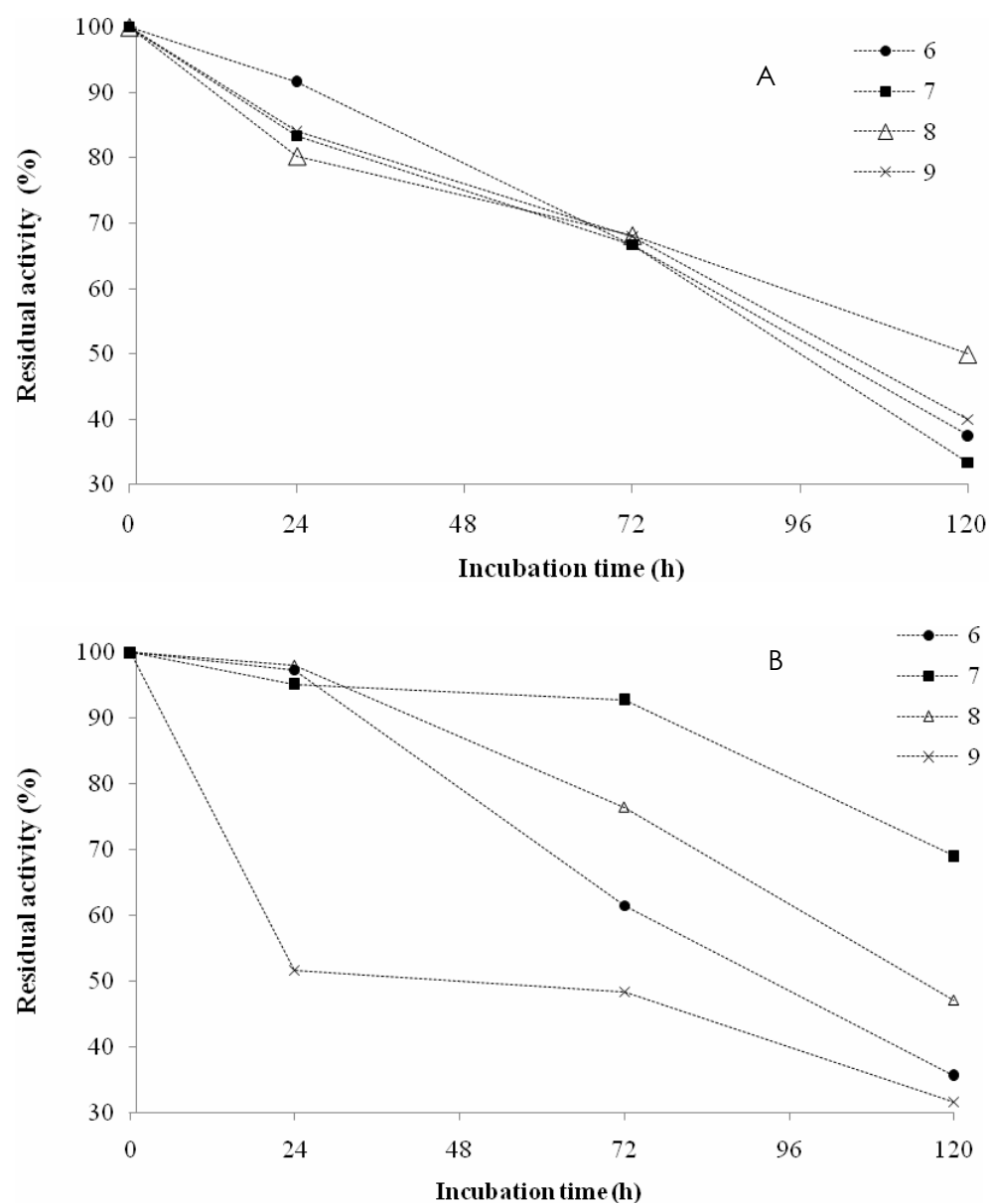


Figure 4. pH effect on stability of FL (A) and SIL (B) at different incubation time at 25°C. Lipolytic activity measured by titrimetric method on olive oil substrate.

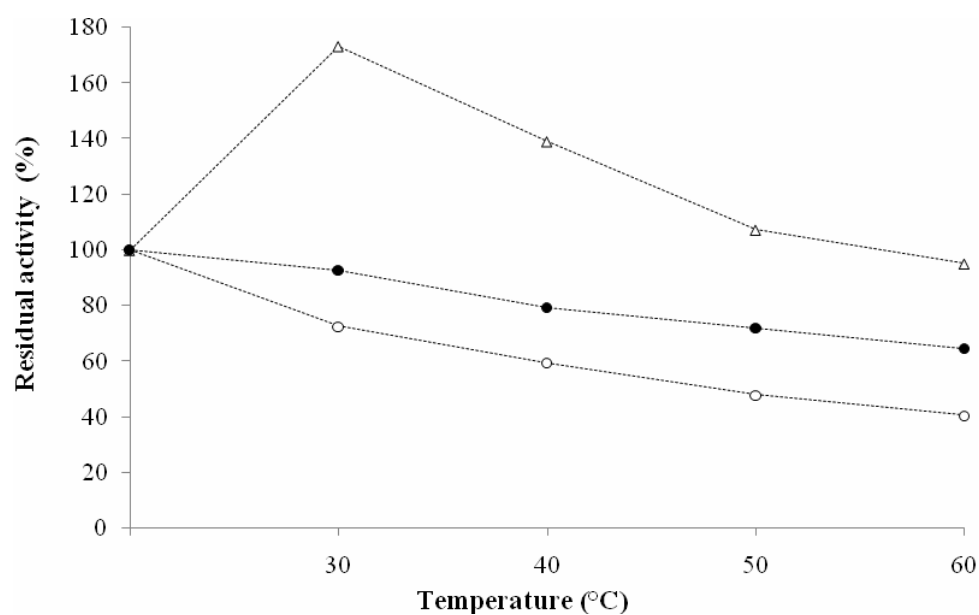


Figure 5. Thermal stability of FL (○) and SIL (●) in aqueous medium (TRIS-HCl buffer pH 8,5), and SIL (Δ) in organic medium (n-heptane). Activity measured by titrimetric method on olive oil substrate (aqueous medium) and esterification method (n-heptane).

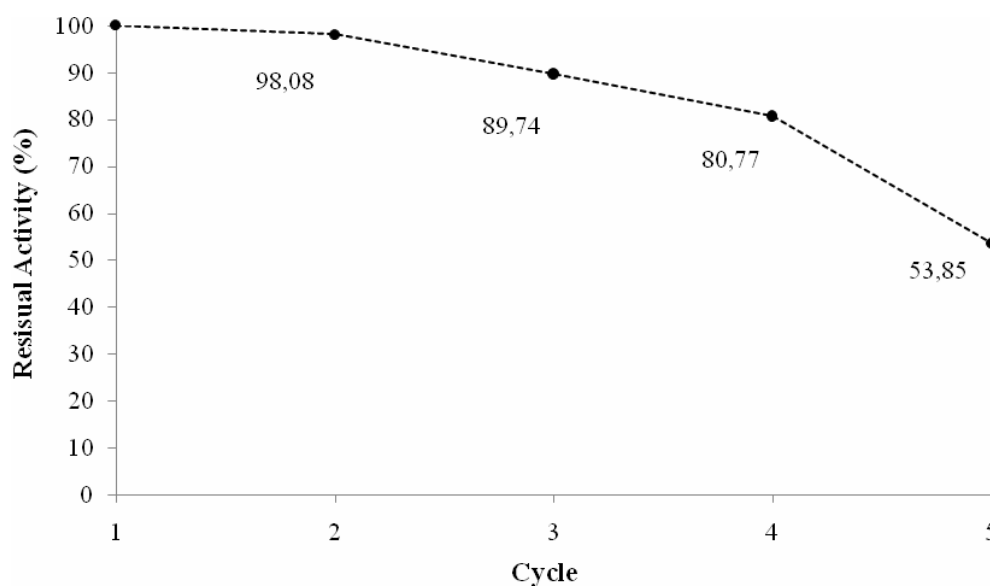


Figure 6. Operational stability of SIL. Activity measured by esterification method with 24 h incubation each cycle.

Table 2. Effect of the environment on desorption of *B. bassiana* CG481 lipase immobilized on silica gel.

Time of incubation (min)	Desorption of lipase (%)		
	0.1 M phosphate buffer pH 7.0	0.8M NaCl	0.1% (v/v) Triton X- 100
30	12.1	2.2	33.7
60	13.8	3.8	37.0

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)