

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Produção, purificação e
imobilização de lipases produzidas
por *Beauveria brongniartii*

Ana Claudia Vici

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Produção, purificação e
imobilização de lipases produzidas
por *Beauveria brongniartii*

Ana Claudia Vici

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Ribeirão Preto
2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Vici, Ana Claudia

Produção, purificação e imobilização de lipases produzidas por *Beauveria brongniartii*. Ribeirão Preto, 2010.

139 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Polizeli, Maria de Lourdes Teixeira de Moraes.

1. Lipase. 2. *Beauveria brongniartii*. 3. Purificação. 4. Imobilização. 5. Planejamento fatorial.

"As verdadeiras ciências são aquelas que a experiência fez penetrar através dos sentidos, silenciando a língua dos litigantes, e que não adormecem seus pesquisadores, mas sim sempre procedem a partir de verdades primordiais e princípios notórios..."

Leonardo da Vinci

Aos meus pais, Antônio e Glória, às minhas irmãs, Joselaine e Josana, ao Carlos e à minha orientadora Maria de Lourdes por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio, amor e carinho.

Agradecimentos

A Deus por iluminar os caminhos que escolhi.

Aos meus pais, por apoiarem as minhas escolhas e acreditarem sempre em mim. Pelo amor, carinho e exemplo de cidadãos. A toda a minha família por todo o apoio e amizade.

À professora Maria de Lourdes T. M. Polizeli, minha orientadora e amiga, por acreditar em mim, pelo apoio, pelas longas conversas e por todo o conhecimento transmitido.

Aos professores João Atílio, Héctor F. Terenzi e Luís Henrique pelos ensinamentos e pela colaboração ao desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Luís Alexandre Pedro (FCFRP - USP) e Maria Isabel Rodrigues (FEA - UNICAMP) por me auxiliarem nas análises estatísticas.

Ao Carlos S. Fernandes, pelo amor, carinho, respeito, puxões de orelhas e paciência em estar sempre ao meu lado, me agüentando e me esperando quando tive que ficar até tarde e aos finais de semana e feriados no laboratório.

Aos amigos de laboratório, que por todo o tempo de desenvolvimento desse trabalho foram companheiros, amigos e professores. Em especial a Simone, ao Tony e a Marita pela paciência nos ensinamentos e pelo apoio e amizade. À Juliana e ao Paulo, por me acompanharem nos experimentos noturnos. Aos estagiários Fábio e Pedro, pela ajuda em vários experimentos. Aos amigos da pós-graduação pelos grupos de estudos e pelos momentos de descontração e alegria.

Às minhas grandes amigas, amigas para toda uma vida, Luziene, Sandra, Fernanda e Elise, por todo carinho e confiança depositados em mim.

Aos técnicos Ricardo, Maurício e Mariana , pelo auxílio técnico, pela amizade e pelos momentos de descontração.

À Maria Ivone por ser grande amiga de todos e portadora das melhores notícias.

À Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização deste trabalho e aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelos valiosos ensinamentos.

À todos que tenham contribuído de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro.

"Se eu vi mais longe, foi por estar de
pé sobre ombros de gigantes"

Isaac Newton

RESUMO

Lipases (EC 3.1.1.3) são um grupo de enzimas que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos. Este trabalho objetivou a prospecção de fungos filamentosos produtores de lipases, o estudo da produção de lipases em fermentação submersa (FSm) e em estado sólido (FES) e a purificação, imobilização e caracterização dessas enzimas. Das amostras de solo e serragem coletadas no depósito de óleos da FFCLRP-USP, foram isolados 36 fungos, dos quais vários apresentaram potencial como produtores de lipases. Dos fungos analisados *Beauveria brongniartii* foi o que apresentou maior produção lipolítica, tanto intra como extracelular, quando incubado a 25° e 30°C. O melhor meio de cultivo em FSm para a produção de lipases foi o meio Khanna, adicionado de óleo de canola 1% (v/v), sob agitação (100rpm), por 72 horas. A adição de D-glucose 0,5% (m/v) a este meio aumentou a produção de lipase em 110%. Tanto extrato de levedura como peptona foram fontes de nitrogênio que incrementaram o crescimento e a produção de lipases do fungo. Estudos com delineamentos experimentais mostraram que a D-glucose e a peptona interferem negativamente na produção de lipases, sendo necessária a utilização de concentrações mais baixas desses componentes, de 0,25% e 0,05% (m/v), respectivamente. Além disso, óleo de canola interfere de modo positivo nessa produção, podendo-se utilizar concentrações de 3,5% (v/v) deste. A produção de lipases em FES foi máxima em meios com farelo de trigo umedecido com água deionizada, por 7 dias. A adição de óleo nim 10% (v/v) aumentou os níveis enzimáticos de lipase em 60%, em contraste ao observado com a adição de fontes extras de nitrogênio. Planejamento fatorial mostrou que o farelo de trigo interfere negativamente na produção de lipases, enquanto a água interfere de forma positiva, ficando padronizado para FES o meio contendo 4g de farelo de trigo, 9 mL de água e 0,4 mL de óleo nim. O extrato produzido por FES possui maior atividade lipolítica que o filtrado da FSm, entretanto este último possui atividade específica muito maior que o outro, sendo mais interessante para estudos de purificação. Quanto à caracterização, as lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e as produzidas por FES apresentam temperatura ótima de 60°, 70° e 60°C, respectivamente. As intra e extracelulares são termoestáveis até 70°C por 180 min, enquanto que as produzidas por FES são estáveis até 60°C por 180 min. O pH ótimo de atividade abrange uma faixa entre 4,5 e 6,5 para todos os extratos. As lipases intracelulares são estáveis em pHs de 2,5 a 7,5, as extracelulares de 5 a 7,5 e as de FES de 2,5 a 8,0. As lipases produzidas em FSm são mais estáveis a solventes orgânicos que aquelas produzidas por FES. O extrato produzido por FES apresentou maior atividade lipolítica contra substratos naturais do que o filtrado produzido por FSm, hidrolisando melhor o óleo de girassol e de oliva, enquanto que o filtrado de FSm hidrolisou melhor trioleína e óleo de soja. O filtrado da FSm foi parcialmente purificado por cromatografia em DEAE-Celulose e Octyl-Sepharose, isolando uma lipase de 46,85 kDa, com recuperação de 15,67% e fator de purificação de 5,12. Essa enzima possui pH e temperatura ótimo, determinados por planejamento fatorial, de 5,5 e 45°C, respectivamente. Essa enzima é termoestável a 70°C por 180 min e é parcialmente inibida por CoCl_2 , NaH_2PO_4 e HgCl_2 . K_M e $V_{\text{máx}}$ ficaram em torno de 2,05-3,2 μmol e 185-227 U/mg de proteína, respectivamente. Um segundo tipo de lipase presente no filtrado foi purificado e imobilizado em um único passo em DEAE-Celulose. Essa lipase, com massa molecular estimada de 22,12 kDa, teve taxa de retenção no suporte de 51,04 e fator de purificação de 5,2. Essa enzima possui pH e temperatura ótimo, determinados por planejamento fatorial, de 5,5 e 55°C, respectivamente; é termoestável a 70°C por 240 min e foi mais termoestável a 75°C que na forma livre (T_{50} de 15 min), com T_{50} de 25 min. A adição de glicerol 20% (v/v) aumentou a estabilidade da enzima imobilizada nessa temperatura, tendo T_{50} de 110 min. MgCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, NaCl e HgCl_2 inibiram parcialmente a atividade dessa enzima. K_M e $V_{\text{máx}}$ ficaram em torno de 1,12-1,26 μmol e 90 U/mg de proteína, respectivamente.

ABSTRACT

Lipases (EC 3.1.1.3) are a group of enzymes that act on the oil-water interface, which catalyzes the hydrolysis of the ester-carboxylic bounds releasing fat acids and organic alcohols as products. The aim of this work was to promote a prospect of filamentous fungi for lipase producers, the study of lipase production in submerged fermentation (SmF) and in solid state (SSF), as well as the purification, immobilization and characterization of these enzymes. Soil and sawdust were collected in the oil warehouse at FFCLRP-USP. From these samples, 36 fungi were isolated of which various showed a potential lipase production. All fungi were analyzed and *Beauveria brongniartii* had the highest intracellular and extracellular lipolytic production when it was incubated in temperatures varying from 25 to 30°C. The best lipase production in SmF was obtained with Khanna medium with 1% canola oil, under agitation (100 rpm), for 72 h. When this medium was supplemented with 0.5% D-glucose, lipase production increased 110%. Yeast extract as well as peptone used as nitrogen sources improved fungus growth and lipase production. Experimental design studies showed that D-glucose and peptone negatively interfere in lipase production, so it is necessary to use lower concentrations of these components, 0.25% and 0.05% respectively. However, canola oil positively interferes in such production, being possible to use 3.5% of it. The maximum lipase production in SSF was achieved with wheat bran humidified with distilled water, for 7 days. The addition of 10% (v/v) neem oil increased the lipase enzymatic levels by 60% opposed to what was observed with the extra nitrogen sources added. Factorial planning resulted that wheat bran negatively interfered in lipase production, while water interfered positively, so it was standardized SSF medium with wheat bran 4g, water 9 mL, and 0.4 mL of neem oil. The extract produced by SSF has a higher lipolytic activity than SmF, however, the latter presents a much higher specific activity, so that it is more interesting for purification studies. Regarding lipase characterization, the intra- and extracellular enzymes produced by SmF and those produced by SSF showed optimal temperature of 60, 70 and 60°C, respectively. Intracellular enzymes as well as extracellular ones are thermostable up to 70 °C for 180 min while, those produced by SSF are stable up to 60°C for 180 min. The optimum pH activity comprises a range between 4.5 and 6.5 for all tested extracts. Intracellular lipases are stable in a pH range varying between 2.5 to 7.5, extracellular vary in a range between 5 to 7.5 and SSF between 2.5 to 8.0. Lipases produced by SmF are more stable in the presence of organic solvents than those produced by SSF. The extract produced by SSF presented higher lipolytic activity against natural substrates than the filtrate produced by SmF. SSF hydrolyzed sunflower oil and olive oil better, while the SmF extracellular lipases hydrolyzed triolein oil and soil oil better. The SmF filtrate was partially purified by successive steps in DEAE-Cellulose and Octyl-Sepharose chromatographies, which isolated a 46.85 kDa lipase, resulting in 15.67% recovering and a purification factor of 5.12-fold. This enzyme had an optimum pH and temperature determined by factorial design of 5.5 and 45°C, respectively. This was a thermostable enzyme at 70°C for 180 min and it was partially inhibited by CoCl_2 , NaH_2PO_4 and HgCl_2 . It also presented K_M and V_{max} around 2.05-3.2 μmol and 185-227 U/mg of protein, respectively. A second lipase type present in the filtrate was purified and immobilized after only one step in DEAE-Cellulose. This lipase presented an estimated molecular mass of 22.12 kDa. It had a retention rate of 51.04 and a purification factor of 5.2-fold. It had an optimum pH and temperature determined by factorial design of 5.5 and 55°C, respectively. It was thermostable at 70°C for 240 min and it was more stable at 70°C than in its free form (T_{50} of 15 min), with T_{50} of 25 min. At this temperature, the addition of 20% glycerol enhanced the immobilized enzyme stability, having a T_{50} of 110 min. MgCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, NaCl and HgCl_2 partially inhibited the immobilized enzyme activity. K_M and V_{max} were around 1.12-1.26 μmol and 90 U/mg of protein, respectively.

ÍNDICES

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
ÍNDICES	v
Sumário	vi
Índice de figuras	ix
Índice de tabelas	xi
Lista de abreviaturas	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Microrganismo selecionado	3
1.2 Lipases	5
1.2.1 Fontes de obtenção	5
1.2.2 Definição	7
1.2.3 Aspectos estruturais de lipases e ativação interfacial	9
1.2.4 Mecanismo de catálise	13
1.2.5 Cinética de lipases	14
1.3 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas	15
1.4 Purificação de lipases	17
1.5 Aplicações industriais das lipases e mercado	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Coleta e isolamento dos fungos	25
3.2 Manutenção dos fungos em laboratório	25
3.3 <i>Screening</i> de fungos filamentosos produtores de lipases	26
3.4 Identificação do fungo bom produtor de lipases	26
3.5 Fermentação submersa (FSm)	27
3.5.1. Meio de cultura Adams	27
3.5.2. Meio de cultura Khanna	27
3.5.3. Meio de cultura Vogel	28
3.5.4. Meio de cultura M5	29
3.5.5. Meio de cultura SR	29
3.5.6 Fontes de carbono suplementadas em FSm	29
3.5.7 Fonte de nitrogênio	30
3.6 Fermentação em estado sólido (FES)	30
3.6.1 Fontes de carbono indutoras da produção de lipase em FES	30
3.6.2 Suplementação da cultura com diferentes fontes de nitrogênio	31
3.7 Otimização da produção de lipase através do delineamento fatorial	31
3.8 Extração do extrato bruto intracelular e extracelular produzido por FSm	33
3.9 Extração de enzimas extracelulares produzidas por FES	33

3.10 Dosagem enzimática	34
3.10.1 Meio reacional para a determinação da atividade lipolítica	35
3.11 Dosagem de proteínas	35
3.12 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das lipases à temperatura, ao pH e a solventes orgânicos	36
3.13 Purificação parcial da lipase extracelular produzida em FSm.....	36
3.14 Imobilização e purificação da lipase por adsorção ao trocador aniônico DEAE-Celulose	37
3.15 Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE).....	38
3.16 Determinação da atividade lipolítica em gel de poliácridamida (PAGE 7%)	38
3.17 Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	38
3.18 Caracterização físico-química das lipases parcialmente purificadas e do derivado	39
3.18.1 Otimização das condições de reação enzimática através do delineamento fatorial	39
3.18.2 Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade enzimática.....	40
3.19 Determinação das constantes cinéticas	41
3.20 Análise dos experimentos	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Isolamento de fungos filamentosos	43
4.2 Pré-seleção de cepa para a produção de lipases	45
4.3 <i>Screening</i> de fungos produtores de lipases por fermentação submersa.....	46
4.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo e sobre a produção de lipases em FSm	50
4.5 Influência de fatores nutricionais e físico-químicos na produção e secreção de lipases de <i>B. brongniartii</i> incubado em FSm	52
4.5.1 Definição do meio de cultura para FSm.....	52
4.5.2 Produção de lipases em FSm em função do tempo e das condições físicas de cultivo	54
4.5.3 Efeito da fonte de nitrogênio sobre o crescimento de <i>B. brongniartii</i> e sobre a produção de lipases em FSm.....	56
4.5.4 Efeito de fontes de carbono indutoras da produção de lipases produzidas por FSm.....	58
4.5.5 Adição de D-glucose 0,5% associada a diferentes fontes de carbono indutoras da produção de lipase em FSm	59
4.5.6 Avaliação do efeito da concentração de óleo de canola, D-glucose e peptona sobre a produção de lipases em FSm através de planejamento fatorial	61
4.6 Influência de fatores nutricionais na produção e secreção de lipases de <i>B. brongniartii</i> incubado em FES.....	65
4.6.1 Variação do substrato para a produção de lipases em FES	65
4.6.2 Produção de lipases em FES em função do tempo de cultivo.....	67
4.6.3 Efeito de diferentes soluções salinas na produção de lipases em FES.....	68
4.6.4 Efeito da adição de fontes extras de nitrogênio na produção enzimática em FES	68
4.6.5 Efeito de fontes de carbono indutoras da produção de lipases produzidas por FES	70
4.6.6 Avaliação do efeito da proporção de farelo de trigo, água e óleo de nim sobre a produção de lipases em FES através de planejamento fatorial.....	71
4.7 Comparação entre as produções padronizadas dos meios de fermentação FSm e FES.....	75
4.8 Caracterização bioquímica dos extratos brutos de <i>Beauveria brongniartii</i> produzidos por FSm e por FES.....	76
4.8.1 Influência da temperatura na atividade das lipases produzidas por FSm e FES	76

4.8.2 Termoestabilidade das lipases de <i>B. brongniartii</i> produzidas por FSm e FES	77
4.8.3 Influência do pH na atividade das lipases produzidas por FSm e FES	79
4.8.4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas por <i>B. brongniartii</i> em FSm e FES	79
4.8.5 Estabilidade a solventes orgânicos das lipases produzidas por <i>B. brongniartii</i> em FSm e FES82	
4.8.6 Avaliação da atividade lipolítica do extrato extracelular produzido por FSm e do extrato produzido por FES sobre substratos naturais.....	83
4.9 Estudos de purificação parcial do extrato bruto extracelular produzido por FSm pelo fungo <i>B. brongniartii</i>	85
4.9.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), não desnaturante (PAGE) e atividade em gel de agarose 1%	87
4.9.2 Otimização das condições de reação da lipase parcialmente purificada através de delineamento fatorial 88	
4.9.3 Termoestabilidade da lipase parcialmente purificada	91
4.9.4 Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da lipase parcialmente purificada	91
4.9.5 Constantes cinéticas da lipase parcialmente purificada	92
4.10 Estudos de imobilização e purificação de uma lipase de baixa massa molecular produzida por FSm pelo fungo <i>B. brongniartii</i>	94
4.10.1 Imobilização da segunda lipase presente no extrato bruto de <i>B. brongniartii</i>	94
4.10.2 Eletroforese da lipase imobilizada em condições denaturantes (SDS-PAGE).....	96
4.10.3 Otimização das condições de reação do derivado através de delineamento fatorial	97
4.10.4 Termoestabilidade do derivado e efeito da adição de glicerol 20% na estabilidade térmica ..	99
4.10.5 Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade do derivado..	100
4.10.6 Constantes cinéticas do derivado	102
5. DISCUSSÃO	103
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124

Índice de figuras

Figura 1. Conidióforos de <i>Beauveria brongniartii</i>	4
Figura 2. <i>Psacothaea hilaris</i> contaminado por <i>Beauveria brongniartii</i>	4
Figura 3. <i>Beauveria brongniartii</i> (<i>Cordyceps brongniartii</i>).	5
Figura 4. Reações catalisadas por lipases.	8
Figura 5. Características da superfície de uma lipase de <i>Candida rugosa</i>	9
Figura 6. Modelo estrutural de α/β hidrolase.....	9
Figura 7. Estrutura de uma lipase de <i>Rhizomucor mihei</i> evidenciando o sítio catalítico.	10
Figura 8. Estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida rugosa</i> , mostrando de forma sobreposta a “tampa” na conformação aberta e fechada (Grochulski <i>et al.</i> , 1994).	11
Figura 9. Mecanismo catalítico de lipases.	14
Figura 10. Demanda mundial de celulasas, amilases e lipases.	20
Figura 11. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.....	44
Figura 12. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.....	45
Figura 13. Proteína total das cepas utilizadas para <i>screening</i> de fungos produtores de lipases.....	48
Figura 14. Crescimento de <i>B. brongniartii</i> a 25°, 30°, 35° e 40°C.....	50
Figura 15. Efeito da temperatura de incubação na produção de proteínas e na produção de lipases intra e extracelulares por <i>B. brongniartii</i>	51
Figura 16. Determinação do meio de cultura para cultivo do fungo <i>B. brongniartii</i>	53
Figura 17. Proteína total e atividade lipolítica em função do tempo de crescimento em horas e da condição de cultivo.	55
Figura 18. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de proteínas e de lipases por <i>B. brongniartii</i>	57
Figura 19. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lipases pelo fungo <i>B. brongniartii</i> em FSm.	59
Figura 20. Efeito da adição de D-glucose 0,5% ao meio de cultura, suplementado com diferentes fontes de carbono, sobre a produção de lipases de <i>B. brongniartii</i>	60
Figura 21. Superfície de resposta para o planejamento fatorial para FSm delineado para as variáveis óleo de canola, D-glucose e peptona.	64
Figura 22. Efeito de diferentes substratos sobre a produção de lipases em FES pelo fungo <i>B. brongniartii</i>	66
Figura 23. Efeito do tempo de cultivo na produção de lipases em FES pelo fungo <i>B. brongniartii</i>	67
Figura 24. Efeito da solução utilizada para umedecer o meio para FES sobre a produção de lipases por <i>B. brongniartii</i>	68

Figura 25. Efeito da adição de fontes de nitrogênio em FES sobre a produção de lipases por <i>B. brongniartii</i>	69
Figura 26. Efeito da adição de óleos em FES sobre a produção de lipases por <i>B. brongniartii</i>	70
Figura 27. Superfície de resposta para o planejamento fatorial para FES delineado para as variáveis farelo de trigo, água e óleo nim.	74
Figura 28. Temperatura ótima de ensaio para as lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e para as lipases produzidas em FES.	76
Figura 29. Termoestabilidade das lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES em função do tempo de incubação.	78
Figura 30. pH ótimo de ensaio para as lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e para as lipases produzidas em FES.	80
Figura 31. Estabilidade ao pH das lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES.	81
Figura 32. Estabilidade a solventes orgânicos das lipases intra e extracelulares produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES.	83
Figura 33. Atividade enzimática do extrato bruto extracelular produzido por FSm e do extrato bruto produzido por FES sobre diferentes óleos vegetais.	84
Figura 34. Distribuição de proteínas e atividade lipolítica do extrato enzimático extracelular produzido por FSm após eluição em cromatografia de troca aniônica DEAE-Celulose e de interação hidrofóbica Octyl-Sepharose.	86
Figura 35. Eletroforese e representação logarítmica da massa molecular da lipase parcialmente purificada de <i>Beauveria brongniartii</i>	88
Figura 36. Superfície de resposta para o planejamento fatorial delineado para as variáveis temperatura (°C) e pH, para a lipase parcialmente purificada do filtrado produzido por FSm.	90
Figura 37. Termoestabilidade das lipases parcialmente purificada em função do tempo de incubação.	91
Figura 38. Representação gráfica do Km (μmol) e da Vmáx (U/mg proteína) da lipase parcialmente purificada frente ao substrato <i>p</i> -nitrofenilpalmitato.	94
Figura 39. Cinética de imobilização das lipases em DEAE-Celulose.	95
Figura 40. Eletroforese e representação logarítmica da massa molecular da lipase II de <i>Beauveria brongniartii</i> imobilizada e purificada em DEAE-Celulose.	96
Figura 41. Superfície de resposta para o planejamento fatorial delineado para as variáveis temperatura (°C) e pH, para a lipase do filtrado produzido por FSm que foi imobilizada.	99
Figura 42. Termoestabilidade da lipase imobilizada em DEAE-Celulose.	100
Figura 43. Representação gráfica do Km (μmol) e da Vmáx (U/mg proteína) da lipase parcialmente purificada frente ao substrato <i>p</i> -nitrofenilpalmitato.	102

Índice de tabelas

Tabela 1. Lipases fúngicas comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK).....	7
Tabela 2. Procedimento de purificação de lipases de espécies de <i>Penicillium</i> e de <i>Rhizopus</i>	19
Tabela 3. Demanda mundial de lipases por aplicação (em milhões de dólares) (Sá-Pereira <i>et al.</i> , 2008)..	21
Tabela 4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com variáveis independentes codificadas para a otimização da produção de lipases	32
Tabela 5. Valores reais das variáveis independentes codificadas para a otimização da produção de lipases	33
Tabela 6. DCCR, com variáveis independentes codificadas para a otimização da reação enzimática.	40
Tabela 7. Valores reais das variáveis independentes codificadas para a otimização da reação enzimática 40	
Tabela 8. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.....	43
Tabela 9. Teste em placa de Petri para a pré-seleção de cepas produtoras de lipases	46
Tabela 10. Atividade lipolítica intracelular e extracelular dos fungos submetidos a <i>screening</i>	49
Tabela 11. Atividade lipolítica total produzida pelos extratos brutos extracelulares de <i>B. brongniartii</i> cultivado em FSm através do DCCR.....	62
Tabela 12. Coeficientes de regressão para a produção de lipase em FSm.....	63
Tabela 13. ANOVA para a produção de lipases em FSm.	63
Tabela 14. Atividade lipolítica total produzida pelos extratos brutos de <i>B. brongniartii</i> através de planejamento fatorial para produção em FES.....	72
Tabela 15. Coeficientes de regressão para a produção de lipase em FES.	73
Tabela 16. ANOVA para a produção de lipases por FES.....	73
Tabela 17. Comparação entre os dois tipos de fermentações otimizadas para a produção de lipases	75
Tabela 18. Purificação de uma fração de lipases extracelulares produzidas por FSm.....	87
Tabela 19. Atividade lipolítica em U/mL da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH através do DCCR.	89
Tabela 20. Coeficientes de regressão para a atividade da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH.	89
Tabela 21. ANOVA para a atividade da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH.	90
Tabela 22. Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da lipase parcialmente purificada	92
Tabela 23. Análises cinéticas da lipase parcialmente purificada de <i>B. brongniartii</i>	94
Tabela 24. Purificação e tratamento do derivado	95
Tabela 25. Dessorção da lipase do suporte DEAE-Celulose com Triton X-100 1%	96

Tabela 26. Atividade lipolítica em U/g do derivado em função da temperatura e pH através do DCCR. .	98
Tabela 27. Coeficientes de regressão para a atividade da lipase imobilizada em função da temperatura e do pH.	98
Tabela 28. ANOVA para a atividade da lipase imobilizada em função da temperatura e do pH.	98
Tabela 29. Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade do derivado....	101
Tabela 30. Análises cinéticas da lipase de <i>B. brongniartii</i> imobilizada em DEAE-Celulose.....	102

Lista de abreviaturas

ANOVA	Análise de Variância
cm	centímetros
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DEAE	dietilaminoetil
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
epm	excurções por minuto
FES	Fermentação em Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
g	grama
<i>g</i>	gravidade
h	horas
kDa	kiloDaltons
K_M	constante de Michaelis-Menten
L	litro
m	massa
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
N	normal
pH	potencial hidrogeniônico
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenilpalmitato
q.s.p.	quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
Tris	Tris (hidroxilmetil) aminometano
T_{50}	meia vida
U	unidades de atividade enzimática
v	volume
valor p	nível de significância
$V_{máx}$	velocidade inicial máxima
μ L	Microlitro
μ mol	micromol
°C	graus Celsius
Σ	somatória

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é um dos campos mais promissores para o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado e com menor agressão ao meio ambiente. Contudo, essa não é uma tecnologia nova, pois os homens fizeram uso das enzimas por milhares de anos sem que ao menos conhecessem sua natureza (Said; Pietro, 2004; Bon *et al.*, 2008). A maior parte da história da bioquímica está associada à história das pesquisas com enzimas. Ao final do século XVIII, a catálise biológica foi reconhecida e descrita pela primeira vez, em estudos da digestão da carne pelas secreções do estômago. Em 1800 as pesquisas continuaram com o estudo da conversão do amido em açúcares pela saliva e extratos de plantas (Nelson; Cox, 2006; Bon *et al.*, 2008). A importância das enzimas foi reconhecida apenas em meados do século XIX (Jaeger *et al.*, 1994; Bon *et al.*, 2008). Em 1897, Eduard Büchner descobriu que extratos de levedura poderiam fermentar açúcar em álcool, provando que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam sua função quando removidas das células. Wilhelh Frederick Kühne chamou essas moléculas de enzimas (Nelson; Cox, 2006).

A tecnologia enzimática e a biocatálise são ferramentas promissoras para síntese de compostos de alto valor agregado. Na indústria o interesse por enzimas vem aumentando consideravelmente devido a enorme variedade de aplicações nos diversos setores (Jaeger *et al.*, 1994), como o uso de amilases para diminuir a turbidez e clarificar sucos de frutas ou produção de edulcorantes para refrigerantes, a partir do amido. Na indústria têxtil, celulasas removem restos de celulose do tecido para conferir maciez e também diminuem a viscosidade de sucos. Na indústria papelreira, as xilanases são usadas para clarear a polpa de celulose (Polizeli *et al.*, 2005; Polizeli, 2009).

Até 2001 eram conhecidas cerca de 4000 enzimas, destas, aproximadamente 200 apresentavam interesse comercial (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001). Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, a grande maioria das enzimas industriais é obtida de microrganismos (bactérias e fungos) (Bon *et al.*, 2008). Assim sendo, a procura de fontes mais ricas de enzimas tem sido de grande valor para o ramo da biotecnologia. Os microrganismos são dotados de um imenso potencial de degradação de material orgânico, produzindo um *pool* de enzimas o qual tem sido explorado comercialmente ao longo dos anos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Bon *et al.*, 2008). Desse modo, há necessidade de se explorar a microbiota de ambientes variados a fim de se encontrar novas fontes de enzimas de interesse industrial. Nesse contexto, a bioprospecção pode ser definida e entendida como o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em um

determinado local com objetivo principal da busca de recursos genéticos e bioquímicos com finalidades de exploração comercial (Santos, 2002; Bentes-Gama, 2002; Azevedo, 2003).

Um grupo de enzimas que apresenta importante potencial biotecnológico em diversos setores industriais é o grupo das lipases, com ampla gama de aplicações na indústria alimentícia, bioquímica, de detergentes, de couro, oleoquímica, polpa de celulose, farmacêutica e cosméticos. Seu elevado potencial de aplicação se deve ao fato das lipases apresentarem capacidade de catalisar reações tanto em meio aquoso como em meio orgânico, onde o teor de água é restrito. Além disso, atua sobre uma ampla gama de substratos, tem grande estabilidade à temperatura, pH e solventes orgânicos e possui quimio- regio- e enantioseletividade (Krieger *et al.*, 2004; Hasan; Shah; Hameed , 2006). Portanto, devido ao crescente interesse por lipases e ao surgimento de novos mercados, a descoberta de novas fontes, assim como, o aprimoramento das já existentes é um elemento chave para a biotecnologia (Gupta *et al.*, 2003) e, deste modo, um campo de investigação promissor.

1.1 Microrganismo selecionado

Os fungos são organismos eucariotas, grupo-irmão dos animais. Mais de 70 mil espécies já foram descritas, entretanto estima-se que o número total chegue próximo de 1,5 milhões (Hawksworth, 1991; Hawksworth *et al.*, 1995). Os organismos desse reino são considerados biodegradadores naturais, sendo capazes de exportar enzimas hidrolíticas que quebram macromoléculas constituintes do meio em que crescem (Carlile; Watkinson, 1994; Gow; Gadd, 1995). Os fungos filamentosos, em virtude de sua diversidade metabólica estão presentes em vários ecossistemas e *habitats*, apresentam crescimento rápido, meios de cultura com relativa simplicidade de composição, são fáceis de manusear, as condições de cultivo são facilmente controladas (Trevisan, 2004), ocupam pouco espaço e crescem onde há fonte de carbono associada a calor e umidade. Assim, a prospecção de enzimas de interesse industrial em fungos de solo brasileiro e resíduos ainda é um tema pouco explorado e de potencial interesse biotecnológico.

O fungo filamentoso *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch 1926 (anamórfico de *Cordyceps brongniartii* Shimazu 1989), selecionado nesse estudo, é uma espécie de fungo mesófilo pertencente à divisão Ascomycota. Os ascomicotas são fungos com micélio bem desenvolvido, tipicamente septado, com células uninucleadas, reproduzindo-se

sexualmente por esporos endógenos (ascósporos), que se originam no interior dos ascos e agamicamente por esporos exógenos (conídios) (Silveira, 1995).

Beauveria brongniartii (**Figura 1**) é um fungo entomopatogênico pertencente à ordem Hypocreales e família Clavicipitaceae, que tem sido extensivamente usado como bioinseticida em lavouras orgânicas (Kessler *et al.*, 2004). No Brasil esse gênero inclui cerca de 50 das 300 espécies conhecidas (Silveira, 1995). Esse fungo forma uma colônia branca, às vezes amarelo claro. O micélio recobre todo o hospedeiro (**Figura 2**). O lado reverso da colônia, onde a colônia fica em contato com o substrato, pode se apresentar amarelo ou rosa. As células conidiogênicas se apresentam solitárias ou em pequenos grupos (<http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>; Sasaki *et al.*, 2007). Os conídios se arranjam de forma simpodial (**Figura 3.I-J**) sendo caracterizados por sua forma elipsoidal ou oval (**Figura 1** Figura 1e **Figura 3.J**) (Rehner; Buckley, 2005; Sasaki *et al.*, 2007).

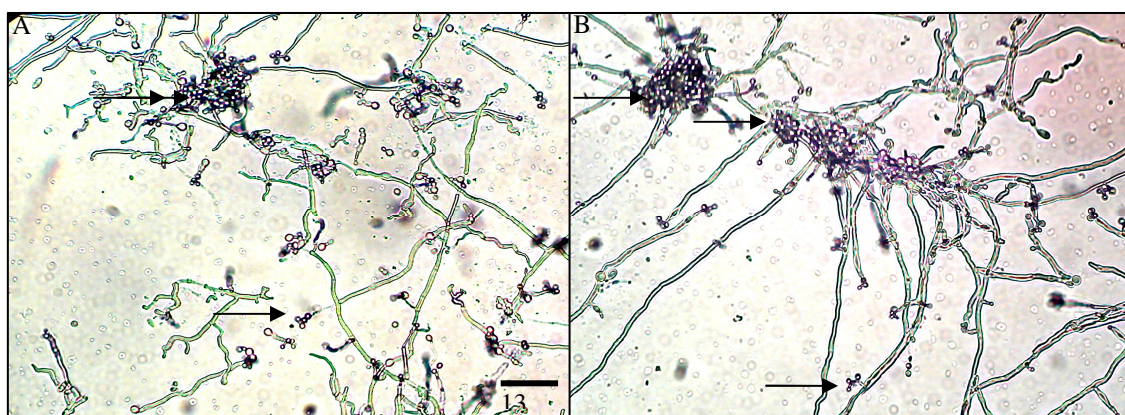


Figura 1. Conidióforos de *Beauveria brongniartii*. (A) e (B) Fotomicrografia do fungo cultivado em meio sólido Khanna, a 30° C, por três dias. Aumento 400x. As setas indicam conídios. Foto: A.C. Vici.



Figura 2. *Psacotha hilaris* contaminado por *Beauveria brongniartii*. Foto: F. Ihara

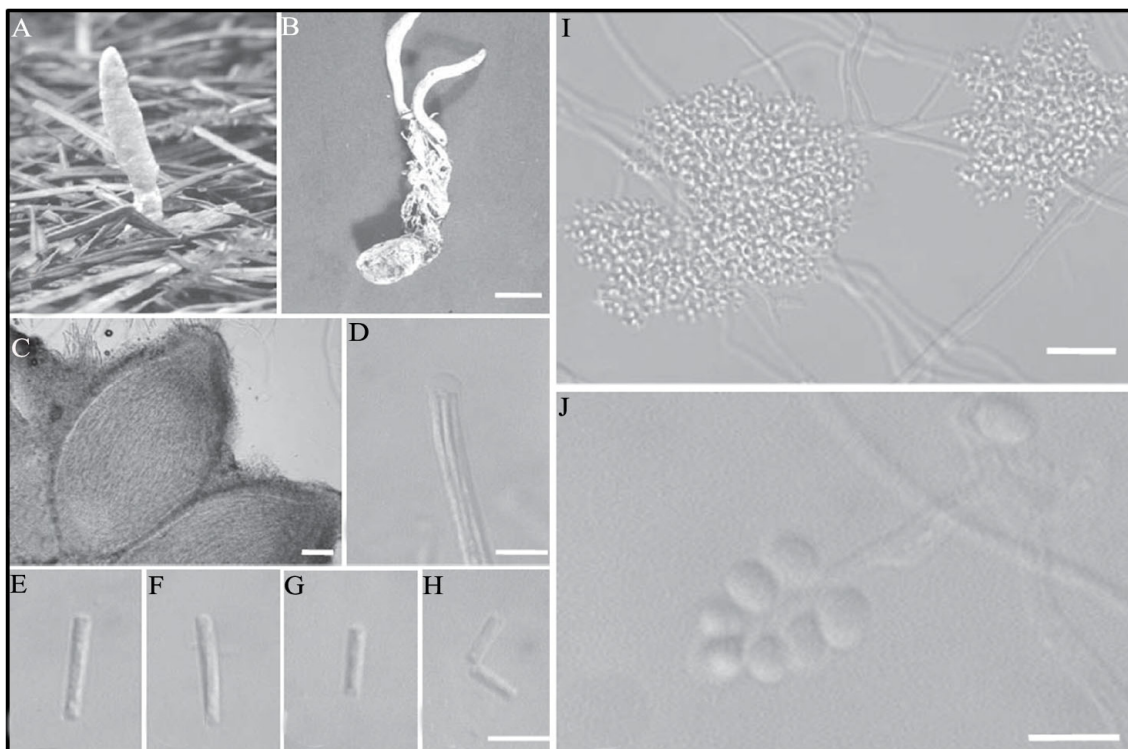


Figura 3. *Beauveria brongniartii* (*Cordyceps brongniartii*). (A) Estroma protuberante à camada da serapilheira. (B) Estroma crescendo sobre uma larva de Coleoptera. (C) Peritécio. (D) Asco com a cabeça semiesférica. (E)-(H) Partesporos. (I) Estruturas conidiogênicas. (J) Conídios. Barras: (B) 10mm; (C) 50µm; (D) 5µm; (E)-(H) 5µm; (I) 40µm; (J) 5µm (Sasaki *et al.*, 2007).

Em sua fase teleomórfica as espécies do gênero *Cordyceps* possuem ascósporos filiformes multisseptados que se fragmentam em pequenos segmentos no interior dos ascos, enquanto sofrem o processo de maturação (Silveira, 1995; <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>). Os ascos são cilíndricos, hialinos, com uma cabeça semi-esférica (**Figura 3.D**). Os ascósporos são filiformes multisseptados e os partesporos são cilíndricos (**Figura 3.E-H**) (<http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>; Sasaki *et al.*, 2007).

1.2 Lipases

1.2.1 Fontes de obtenção

A produção de lipases por bactérias foi primeiro relatada por C. Eijkmann no início do século XX (Jaeger; Eggert, 2002) e a partir de então iniciaram-se os estudos sobre a produção de lipases utilizando-se diversos microrganismos como bactérias, leveduras e bolores. Na década de 1980, foi comprovado que muitas lipases permaneciam ativas em solventes orgânicos. A partir daí intensificaram-se os estudos dessas enzimas, que se tornaram uma ferramenta ideal para a química orgânica (Trevisan, 2004).

Atualmente se conhece um grande número de microrganismos produtores de lipases. Entretanto, este número de microrganismos conhecidos atinge apenas um percentual muito baixo da biodiversidade estimada dos microrganismos que potencialmente podem ser produtores de enzimas em geral e que ainda não foram caracterizados: de 0,2-0,6% para bactérias e de 5% para fungos. Esta abundância de microrganismos existentes na natureza torna importante o *screening* e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (Wubbolts; Bucke; Bieleki, 2000 apud Fernandes, 2007).

Lipases diferem com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Numa perspectiva econômica e industrial, as lipases obtidas de microrganismos são as mais utilizadas, devido à facilidade de manutenção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las, e a facilidade de produção e obtenção dessas enzimas (Jaeger *et al.*, 1994; Sharma; Chisti; Banerjee, 2001). Além disso, as propriedades e especificidade ao substrato das lipases microbianas são de grande interesse industrial (Bancerz; Ginalska, 2007).

Fungos que produzem lipases secretam-na para o meio onde ela promove a hidrólise de lipídios a glicerol e ácidos graxos, os quais podem ser assimilados por esses microrganismos (Carlile; Watkinson, 1994). Estes são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação e também porque a maioria dos fungos não é nociva à saúde humana, sendo reconhecidos como GRAS (Generally Regarded as Safe) (Jaeger *et al.*, 1994).

Lipases produzidas por bolores e leveduras já foram estudadas em algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* sp., *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Neurospora* sp., *Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizomucor* sp., *Rhizopus* sp., *Saccharomycopsis* sp., *Saccharomyces* sp., dentre outros, como revisto por Pandey *et al.* (1999). Lipases de diversas origens são comercializadas atualmente como as lipases de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Penicillium roquefortii* e da levedura *Candida rugosa* que são comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para o processamento de óleos, gorduras e queijos, para uso farmacêutico, como aditivo em preparações digestivas e para a síntese quiral (**Tabela 1**) (<http://www.amano-enzyme.co.jp/>).

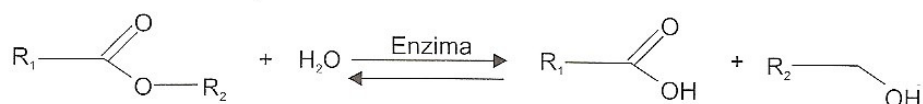
Tabela 1. Lipases fúngicas comercializadas pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK)

Aplicação	Produtos
Síntese quirál	Lipase AS "Amano" (<i>Aspergillus niger</i>)
	Lipase AYS "Amano" (<i>Candida rugosa</i>)
Processamento de alimentos	Lipase A "Amano" 12 (<i>Aspergillus niger</i>)
	Lipase AY "Amano" 30 (<i>Candida rugosa</i>)
	Lipase G "Amano" 50 (<i>Penicillium camembertii</i>)
	Lipase R "Amano" (<i>Penicillium roqueforti</i>)
	Newlase F (<i>Rhizopus niveus</i>)
Uso farmacêutico	Lipase AP6 (<i>Aspergillus niger</i>)
	Lipase AP12 (<i>Aspergillus niger</i>)
Suplemento	Lipase DS (<i>Aspergillus niger</i>)
	Lipase DF-DS (<i>Rhizopus oryzae</i>)

Fonte: [http:// www.amano-enzyme.co.jp/](http://www.amano-enzyme.co.jp/) (2010)

1.2.2 Definição

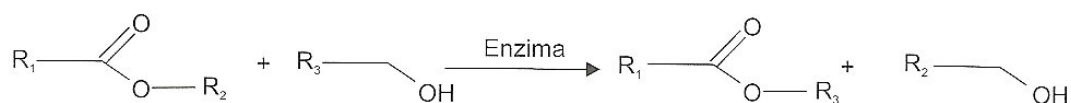
As lipases ou triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3) são um grupo de enzimas que apresentam quimioseletividade, regioseletividade e estereoseletividade (Kim *et al.*, 1997; Karadzic *et al.*, 2006), tendo grande importância para a química moderna e para a indústria farmacêutica (Wang *et al.*, 2002; Freire; Castilho, 2008). Essas enzimas atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e álcoois orgânicos (Jaeger; Reetz, 1998; Wang *et al.*, 2002; Bancarz; Ginalska, 2007; Freire; Castilho, 2008). Pottevin (1906 *apud* Freire; Castilho, 2008) mostrou que em meios aquo-restritos, a reação inversa (esterificação) ou diversas reações de transesterificação podem ocorrer (**Figura 4**) (Freire; Castilho, 2008). Portanto, lipases, em adição a sua atividade de hidrólise, catalisam a esterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise em triglicerídeos, quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Krishna; Karanth, 2001; Gotor, 2002; Fernandes, 2007; Hasan; Shah; Hameed, 2009).

Hidrólise e esterificação**Transesterificações**

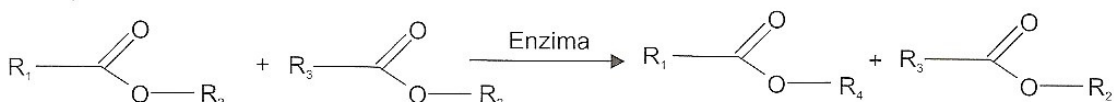
a) Acidólise



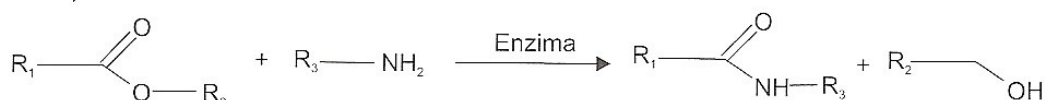
b) Alcoólise



c) Troca de éster



d) Aminólise

**Figura 4.** Reações catalisadas por lipases (Almeida, 2001 *apud* Freire; Castilho, 2008).

Dois critérios têm sido usados para classificar uma enzima lipolítica como lipase verdadeira: (1) ela deve ser ativa na interface orgânico-aquosa (Jaeger *et al.*, 1999; Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Bancarz; Ginalska, 2007; Hasan; Shah; Hameed, 2009); e (2) deve conter uma “tampa”, que é um *loop* formado na superfície da proteína que cobre o sítio ativo da enzima e quando em contato com a interface esse *loop* se afasta, expondo o sítio ativo (Jaeger; Dijstra; Reetz, 1999). Essas duas conformações estão ilustradas na estrutura de superfície da lipase de *Candida rugosa* (**Figura 5**) (Cygler; Schrag, 1999). Entretanto, diversas lipases que não possuem essas duas características têm sido descritas (Jaeger; Dijstra; Reetz, 1999). Portanto, lipases têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, na interface água-lipídio. Não existe uma classificação que defina qual o número mínimo de carbonos de um acilglicerol de cadeia longa, contudo, alguns autores consideram que triacilgliceróis de cadeia longa são aqueles que apresentam ácidos graxos com mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são reconhecidas como esterases-carboxil éster

hidrolases (E.C. 3.1.1.1) (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger; Dijstra; Reetz, 1999; Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Nini *et al.*, 2001; Jaeger; Eggert, 2002).

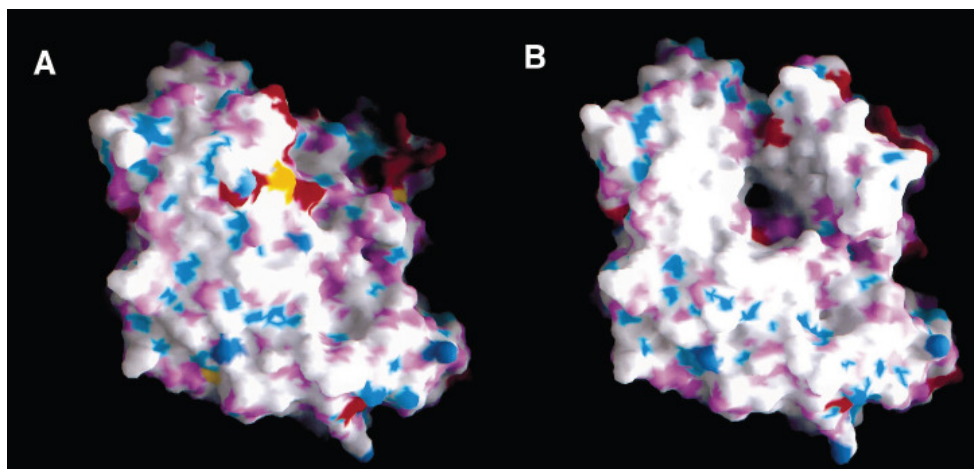


Figura 5. Características da superfície de uma lipase de *Candida rugosa*. (A) Estado fechado e (B) estado aberto. Esquema de cores: vermelho escuro – oxigênios carregados; magenta – oxigênios polares; azul escuro – nitrogênios carregados; azul claro – nitrogênios polares; amarelo- enxofres. (Cygler; Schrag, 1999).

1.2.3 Aspectos estruturais de lipases e ativação interfacial

Estruturas tridimensionais de várias lipases foram determinadas e através destes dados observou-se que a estrutura terciária das lipases descritas, incluindo lipases de eucarioto e procarioto, exibem uma dobra padrão, do tipo α/β hidrolase, encontrado em muitas outras enzimas, como muitas esterases e peptidases (**Figura 6**) (Schrag; Cygler, 1997; Pouderoyen *et al.*, 2001; Freire; Castilho, 2008). As α/β hidrolases apresentam seu núcleo central composto por até oito fitas β paralelas rodeado por até seis α -hélices (Schrag; Cygler, 1997; Holmquist, 2000).

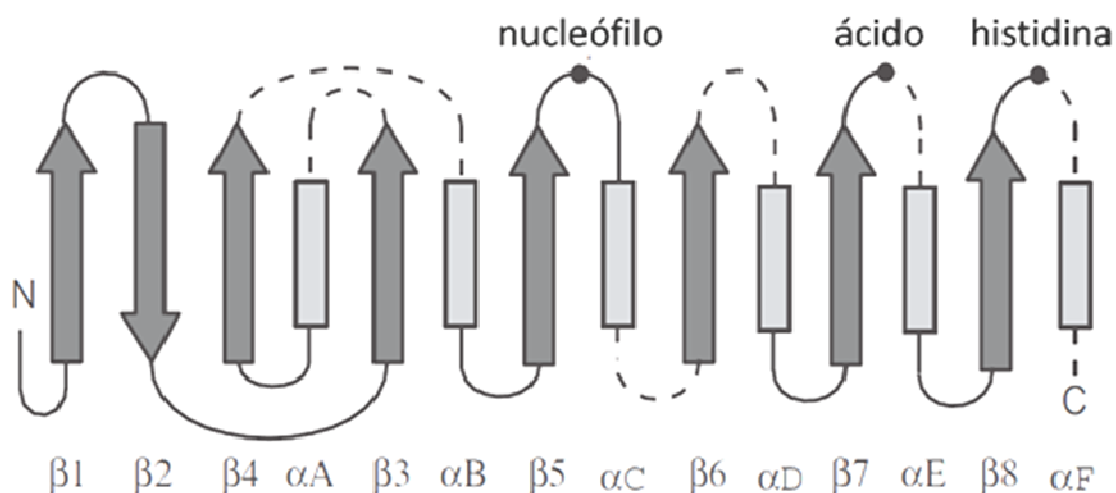


Figura 6. Modelo estrutural de α/β hidrolase. Modificado a partir de Pouderoyen *et al.* (2001).

Lipases contêm um sítio catalítico (**Figura 7**) composto por uma tríade catalítica constituída pelos aminoácidos serina, ácido aspártico ou glutâmico e histidina (G-X1-S-X2-G, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico), semelhante à observada primeiramente em serina-proteases (Jaeger; Reetz, 1998). O sítio catalítico está localizado especificamente no lado C-terminal das fitas β . O nucleófilo catalítico, a serina, está localizado especificamente no C-terminal da fita β_5 em um pentapeptídeo altamente conservado GX SXG, que forma um ângulo nucleofílico com β em torno de α , conhecido como cavidade nucleofílica (Jaeger *et al.*, 1994; Schrag; Cygler, 1997; Jaeger; Dijkstra; Reetz, 1999).

Conforme mencionado anteriormente, muitas das lipases apresentam um *loop* recobrindo o sítio catalítico, chamado de “tampa”, do termo em inglês “*lid*”. Nestas lipases, a cadeia na qual a histidina da tríade catalítica está inserida prolonga-se sobre o sítio catalítico, cobrindo-o como uma tampa e tornando-o inacessível ao substrato (Jaeger *et al.*, 1994; Jaeger; Dijkstra; Reetz, 1999; Schrag; Cygler, 1997; Freire; Castilho, 2008). As estruturas tridimensionais de lipases conhecidas mostram que o grau de mobilidade da “tampa” varia fortemente, encontrando-se casos em que aparentemente há dois estados, o aberto e o fechado, com níveis de energia significativamente inferiores aos estados de transição; e casos com “tampa” muito móvel, com vários estados intermediários com nível de energia comparável (Louwrier; Drtins; Klivanov, 1996; González-Navarro; Baño; Abad, 2001 *apud* Freire; Castilho, 2008).

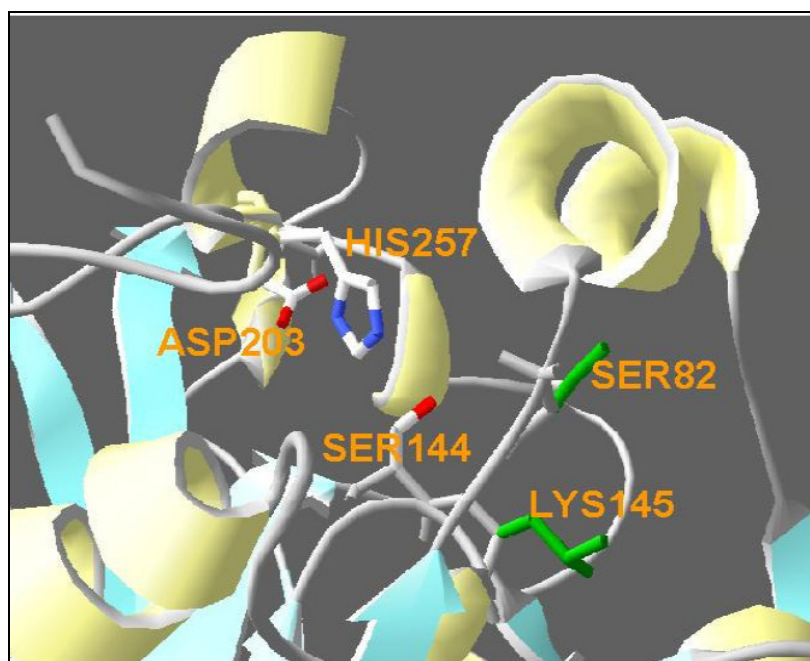


Figura 7. Estrutura de uma lipase de *Rhizomucor mihei* evidenciando o sítio catalítico (Fonte: *Protein Data Bank*).

Estruturas tridimensionais de algumas lipases foram determinadas e encontram-se depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - www.ncbi.nlm.nih.gov/) e outros bancos de dados como o LED (The Lipase Engineering Database) (<http://www.led.uni-stuttgart.de/>). Entre elas, diversas estruturas de lipases de bactérias, como a de *Bukholderia cepacia*, de fungos filamentosos, como a de *Aspergillus awamori*, e de leveduras, como a de *Candida rugosa* (**Figura 8**) estão depositas nesses bancos.

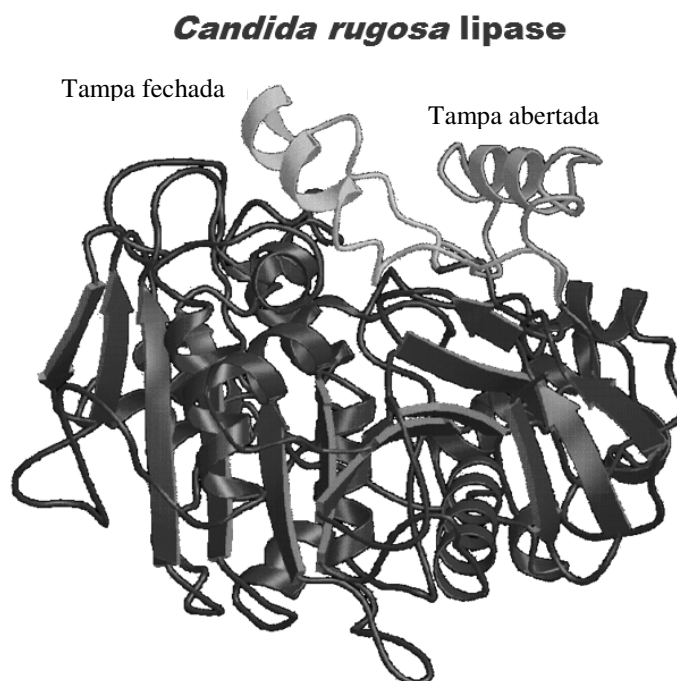


Figura 8. Estrutura tridimensional da lipase de *Candida rugosa*, mostrando de forma sobreposta a “tampa” na conformação aberta e fechada (Grochulski *et al.*, 1994).

Nem todas as lipases apresentam a “tampa”, mas as que possuem foram cristalizadas com a “tampa” fechada – sobre o sítio catalítico, impedindo a catálise – e com a “tampa” aberta – com o sítio catalítico exposto ou ocupado. Nesse último caso a “tampa” pode estar estabilizada por ligações covalentes ou com uma molécula de detergente ligado ao sítio ativo, ou pode não estar estabilizada (Brzozowski *et al.*, 2000). A superfície da lipase que possui “tampa” é basicamente hidrofílica quando a “tampa” está fechada, mas quando esta se encontra aberta, a mudança conformacional da “tampa” expõe uma grande superfície hidrofóbica, permitindo acesso ao sítio ativo. (Cygler; Schrag, 1997; González-Navarro; Baño; Abad, 2001 *apud* Freire; Castilho, 2008; Miled *et al.*, 2003).

Devido ao fato de se observar lipases nas conformações aberta e fechada não apenas dentro de uma família homóloga, mas também em diferentes famílias de lipases, e ao caráter hidrofóbico e a posição da “tampa” sobre o sítio ativo sugere-se que estes estados – conformação aberta e fechada – estariam envolvidos no mecanismo de catálise das lipases (Cygler; Schrag, 1997; Lima 2004; Freire; Castilho, 2008). A baixa atividade de lipases na ausência de interfaces indica que em meio aquosos as conformações fechadas predominam, mas estruturas abertas também existem, ao menos em uma forma transiente. Na presença de uma interface água-lipídio a “tampa” poderia interagir com a interface, sofrer uma alteração conformacional, abrindo-se e tornando o sítio ativo exposto (Jaeger et al., 1994; Schrag; Cygler, 1997; Jaeger; Reetz, 1998; Lima 2004; Freire; Castilho, 2008).

A ativação interfacial foi descrita por Holwerda, Verkade e Willingen (1936 *apud* Lima 2004) e Schønheyder e Volqvartz (1945 *apud* Lima 2004), medindo a atividade da lipase pancreática frente a tricaproína. Nesses experimentos os autores observaram que a hidrólise aumentava quando a concentração do substrato excedia o limite de solubilidade sendo esse fenômeno chamado de ativação interfacial (Lima, 2004). As esterases, por outro lado, atuam somente sobre substratos solúveis em água (Sarda; Desnuelle, 1958 *apud* Dalla-Vecchia; Nascimento; Soldi, 2004). Desta forma, o fenômeno da ativação interfacial seria uma característica das lipases que as distinguiria de outras esterases (Lima, 2004).

Na presença de uma interface água-lipídio a abertura da “tampa” e, conseqüentemente, a ativação da lipase seriam favorecidas pela interação da “tampa” hidrofóbica com a interface formada por substratos hidrofóbicos agregados ou formando micelas. Portanto, a face onde está a “tampa” é a face da superfície das lipases que é direcionada para a camada lipídica. Alguns dados biofísicos, como experimentos com monocamadas lipídicas, indicam que a lipase adsorve à interface e provavelmente penetra parcialmente na camada lipídica (Freire; Castilho, 2008). Entretanto Ferrato *et al.* (1997) mostraram que nem a presença da “tampa” nem a ativação interfacial são características de todas as lipases, como é o caso das cutinases, que são lipases que não possuem “tampa” e não precisam da ativação interfacial para sua atividade (Cygler; Schrag, 1997). Contudo, os dados da literatura nos mostram que a maioria das lipases sofre profundas mudanças conformacionais durante a ativação interfacial, sendo que a “tampa” se move deixando a enzima na forma ativa, com o sítio catalítico exposto e proporcionando uma grande superfície hidrofóbica de interação lipídeo-proteína. Além disso, algumas lipases

podem estar em equilíbrio dinâmico entre a forma aberta e fechada, quando em solução. A abertura da “tampa” pode ser facilitada por solventes orgânicos, provavelmente por diminuição da constante dielétrica do meio. E a interação lipídeo-proteína é complexa, não podendo ser explicada por modelos cinéticos simples (Brzozowski *et al.*, 2000).

1.2.4 Mecanismo de catálise

O mecanismo catalítico das lipases se assemelha ao das proteases devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo destas enzimas. A hidrólise ocorre em quatro etapas e segue o modelo proposto para a quimiotripsina, uma serina protease (**Figura 9**). Evidências deste mecanismo têm sido confirmadas por estudos de ligação de inibidores a lipases e pela análise estrutural destas proteínas (Jaeger; Dijkstra; Reetz, 1999).

O aminoácido serina presente no sítio catalítico é o nucleófilo responsável pela catálise e está unido por pontes de hidrogênio a um resíduo de histidina, este por sua vez está ligado a um resíduo carboxilado, que pode ser um resíduo de aspartato ou de glutamato (**Figura 7**) (Jaeger *et al.*, 1994; Schrag; Cygler, 1997; Jaeger; Reetz, 1998; Eggert *et al.*, 2001).

A hidrólise inicia-se com um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila do resíduo serina ao carbono da carbonila da ligação éster do lipídio. É formado um intermediário tetraédrico, onde o O^- é estabilizado pela interação com dois grupos peptídicos $-NH$; o anel imidazólico da histidina fica protonado e carregado positivamente, sendo estabilizado pela carga negativa do resíduo ácido. Esse intermediário é estabilizado por duas pontes de hidrogênio formadas com ligações amida dos resíduos de aminoácidos. A histidina doa um próton ao componente álcool que está deixando o substrato. Permanece então um intermediário covalente, a enzima acilada, visto que o componente ácido do substrato está esterificado pelo resíduo serina da enzima. Uma molécula de água é ativada pelo resíduo histidina das proximidades e o íon hidroxila resultante realiza um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do intermediário covalente. O resíduo de histidina doa um próton ao átomo de oxigênio do resíduo de serina ativo, a ligação éster entre a serina e o substrato é quebrada, liberando o produto acilado e regenerando a enzima (Jaeger *et al.*, 1994; Bornscheuer; Kazlauskas, 1999; Bornscheuer, 2002).

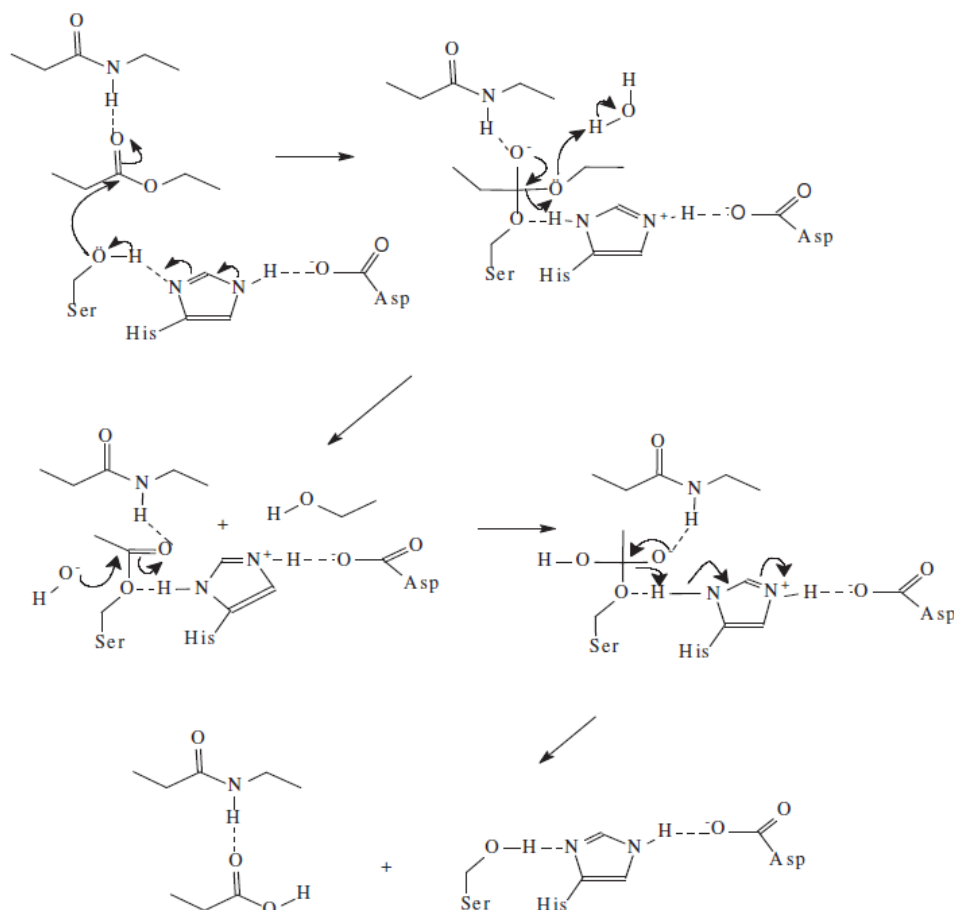


Figura 9. Mecanismo catalítico de lipases (Jaeger *et al.*, 1994).

1.2.5 Cinética de lipases

As lipases exibem baixa atividade hidrolítica quando seus substratos estão dissolvidos em meio aquoso e são monômeros. Um aumento da atividade é pronunciado quando a concentração do substrato atinge o limite de solubilidade, formando agregados ou micelas (Holmquist, 2000). Essa característica das lipases dificulta a determinação dos parâmetros cinéticos, devido à complexidade dessas reações, que ocorrem em sistemas heterogêneos como as emulsões. (Jaeger *et al.*, 1994; Martinelle; Hult, 1994). Como as lipases são mais ativas em sistemas heterogêneos, o comportamento cinético das lipases em meio aquoso não pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten, considerando-se que este é válido para sistemas homogêneos (Brockman, 1984; Jaeger *et al.*, 1994).

Para explicar como ocorre a interação lipase/substrato um modelo foi sugerido por Verger, Mieras e Haas (1973 *apud* Holmquist, 2000). Neste modelo existem dois equilíbrios na equação de reação, sendo que o primeiro entre a enzima inativa solúvel (E) e a enzima ativa na interface água-lipídio (E*). Num segundo momento há outro

equilíbrio entre a quantidade de enzima ativada (E^*) na interface e a quantidade do complexo enzima/substrato (E^*S). Seguida à formação do complexo ocorre a catálise, regenerando a enzima na forma ativa (E^*) e liberando o produto.

Sarda e Desnuelle (1958 *apud* Lima 2004) demonstraram que a cinética de lipases em emulsões depende da interface, e que esta cinética segue o modelo de Michaelis-Menten, se o termo “concentração de substrato” for substituído por “área interfacial”. A partir de então, muitos métodos foram desenvolvidos, baseados em técnicas diversas como as microscópicas ou de monocamada de lipídeos para estudo da cinética das lipases (Verger; Haas, 1976; Wang *et al.*, 1988; Nury *et al.*, 1991, *apud* Lima 2004).

De acordo com a literatura, algumas lipases mostram cinéticas que obedecem a um comportamento similar ao de Michaelis-Menten, com a velocidade de reação sendo proporcional ao aumento da concentração do substrato no sistema. Para se distinguir da cinética clássica de Michaelis-Menten, as constantes são chamadas de aparentes, visto que o substrato não é solúvel no sistema e a enzima atua na interface (Lima, 2004).

1.3 Processos fermentativos na produção de enzimas microbianas

A aplicação de enzimas como biocatalisadores em diversos setores industriais tem crescido consideravelmente. Comparando-as a catalisadores químicos, a grande vantagem das enzimas é a capacidade que elas possuem em catalisar reações sob condições suaves de temperatura e pressão, o que reduz o consumo energético, um dos principais gastos em uma indústria (Brígida, 2006 *apud* Polizelli, 2008). Além disso, a substituição de catalisadores químicos por enzimas é benéfica ao meio ambiente, visto que diminui a poluição. Entretanto o custo das enzimas para a aplicação em indústria é alto, tornando-se muitas vezes inviável economicamente. O meio de fermentação é um dos componentes mais onerosos, que interfere no valor final do produto, por isso é necessário buscar substratos de baixo custo para o processo fermentativo, como resíduos agroindustriais.

No Brasil são geradas anualmente milhares de toneladas de resíduos agrícolas e agroindustriais. Segundo Yang *et al.* (2001) parte desses resíduos é utilizada para a geração de energia elétrica em algumas indústrias, outra parte é utilizada na alimentação animal, mas a maioria fica disponível no campo tornando-se, muitas vezes, um poluente.

O processo de fermentação submersa (FSm) tem sido extensivamente utilizado, entretanto o uso da fermentação em estado sólido (FES) vem aumentando. (Rodriguez Couto; Sanromán, 2005). A escolha de um ou outro processo de fermentação depende

principalmente do microrganismo a ser utilizado, visto que a maioria dos microrganismos não produz quantidades semelhantes das enzimas de interesse em ambos os tipos de fermentação.

A FSm é o tipo de fermentação cujo substrato fica dissolvido ou suspenso no líquido, geralmente água. Nesse tipo de fermentação a água compõe de 90 a 99% da massa total do material a ser fermentado. Na FSm é fácil o acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato, além do controle do pH, temperatura, crescimento celular, oxigenação e esterilidade. Entretanto, grande volume de resíduo é gerado, e a separação do produto do meio de cultivo é difícil (Mitchell *et al.*, 2000).

A FES é um processo de fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas e na qual se emprega um material natural ou sintético como substrato sólido (Pandey; Soccol; Mitchell, 2000; Pandey, 2002; Rodriguez Couto; Sanromán, 2005; Hölker; Lenz, 2005). Esse tipo de fermentação é simples, de baixo custo, geralmente de alta produtividade, e requer menos espaço e energia (Mitchell *et al.*, 2000; Pandey; Soccol; Mitchell, 2000). Entretanto, o controle de parâmetros, como pH, temperatura, umidade e crescimento celular, é difícil. O principal fator limitante, no entanto, refere-se à dificuldade de vários grupos microbianos em crescer sob baixos teores de umidade, o que acaba por restringir o processo ao uso de fungos filamentosos, que se adaptam bem a essa condição. Desse modo, a FES tem se mostrado adequada para a produção de enzimas por fungos filamentosos (Pandey *et al.*, 1999), ao se considerar a possibilidade de reprodução das condições de crescimento natural desses organismos (Pandey, 2002; Rodriguez Couto; Sanromán, 2005).

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para a minimização ou reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais, visando ganho econômico e ambiental. A disposição dos resíduos industriais no meio ambiente deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental (Aquarone; Borzani; Lima, 1990). Muitos resíduos sólidos gerados pela agroindústria são ricos em nutrientes e com alto valor energético e que podem de alguma forma ser reaproveitados minimizando os impactos ambientais e agregando valor de mercado (Laufenberg; Kunz; Nystroem, 2003).

A indústria de biodiesel, atualmente incentivada pelo Programa Nacional de Biodiesel, tem como um dos co-produtos grande quantidade de resíduos provenientes da extração do óleo vegetal, as tortas e farelos. Esses resíduos têm sido estudados para a produção de ração animal e para a adubação de solos (<http://www.biodiesel.org.br>).

Apesar disso, há excedentes cujo destino é o lixo. Esses resíduos podem ser aproveitados como substrato para a produção de enzimas microbianas de interesse industrial como as lipases, agregando valor de mercado a esse co-produto. Resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e palha de arroz e de milho têm sido empregados com sucesso como substratos na produção de enzimas por FES (Peixoto-Nogueira *et al.*, 2008, Silva *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2006). Vargas (2004) estudou a produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando como substrato a torta de soja, proveniente da indústria de extração de óleo vegetal. Igualmente, foram relatados trabalhos em que lipases eram produzidas por fermentação em substrato sólido utilizando bagaço de cana-de-açúcar (Cordova *et al.*, 1998), outro resíduo gerado pela agroindústria de energia.

1.4 Purificação de lipases

Muitas aplicações industriais de lipases não requerem preparações homogêneas da enzima, entretanto certo grau de pureza permite uma utilização mais eficiente. Além disso, a purificação de enzimas permite sua caracterização cinética, a determinação da sua sequência primária de aminoácidos e a determinação de sua estrutura tridimensional através da obtenção de cristais (Saxena *et al.*, 2003). A definição de um protocolo de purificação depende do uso da molécula alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes. Produtos destinados a usos terapêuticos, por exemplo, requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização de enzimas em biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (Kornberg, 1990; Saxena *et al.*, 2003; Gupta; Gupta; Rathi, 2004).

Os métodos de purificação de lipases dependem do microrganismo, do meio e condições de cultivo e das características da enzima. Deste modo, não há processos de purificação de aplicação geral e enzimas produzidas por cepas diferentes do mesmo microrganismo podem apresentar propriedades distintas (Lima, 2004). Assim sendo, diversas estratégias têm sido empregadas para a purificação de lipases e muitos protocolos têm sido elaborados para esse fim. A **Tabela 2** resume o processo de purificação de lipases de alguns fungos filamentosos.

Muitas das lipases microbianas são pré-purificadas através de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio ou extração com solventes orgânicos. Cerca de 80% dos protocolos utilizam precipitação, sendo que 60% destes são com sulfato de amônio e 35% com etanol, acetona ou um ácido (Saxena *et al.*, 2003).

A precipitação é seguida por métodos cromatográficos e, na maioria das vezes, um único método cromatográfico não é suficiente para alcançar o nível de pureza requerida, fazendo-se necessário, portanto, uma combinação de passos cromatográficos. A cromatografia de troca iônica é o método mais comumente utilizado, sendo usada em 67% dos protocolos de purificação. A troca iônica mais frequentemente usada (58%) é aquela que contém o grupo de troca aniônica dietilaminoetil (DEAE) seguida pela carboximetil (CM) (20%), que é um trocador catiônico (Saxena *et al.*, 2003).

A cromatografia por filtração em gel é a segunda mais empregada, sendo usada em 60% dos protocolos de purificação. A cromatografia de interação hidrofóbica também está presente na maioria dos protocolos de purificação, sendo utilizadas colunas com agarose com grupos octila ou fenila (Saxena *et al.*, 2003; Lima, 2004). As cromatografias em Concanavalina A (Con A) e Heparina são utilizadas para lipases de fungos e de mamíferos devido a natureza glicoprotéica dessas enzimas (Tombs; Blake, 1982; Aires-Barros; Cabral, 1991 *apud* Saxena *et al.*, 2003).

De modo geral, para purificar lipases microbianas, alcançando rendimentos de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, 4 a 5 passos de purificação são necessários (Gupta; Gupta; Rathi, 2004, Saxena *et al.*, 2003). Além disso, a formação de agregados de alta massa molar é comumente relatada nos estudos de purificação de lipases, e pode dificultar o processo. A formação desses agregados pode ocorrer devido à presença de lipídeos ou à característica hidrofóbica que a estrutura protéica das lipases apresenta (Lima, 2004).

Como os procedimentos usuais de purificação de lipases são muitas vezes problemáticos, consomem tempo e resultam em uma baixa recuperação da enzima, novas tecnologias de purificação têm sido empregadas para a purificação de lipases, como a imunopurificação, sistemas aquosos de duas fases, entre outras.

Tabela 2. Procedimento de purificação de lipases de espécies de *Penicillium* e de *Rhizopus*

Fungo	Protocolo de purificação	Recuperação (%) / fator de purificação	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>P. cyclopium</i> MI	Precipitação com sulfato de amônio, cromatografias DEAE-Cellulose, DEAE-Sephrose e hidroxiapatita e filtração em gel GC-700.	27%/1380	11	Isobe <i>et al.</i> , 1988
<i>P. simplicissimum</i>	Precipitação com sulfato de amônio, phenyl-Sephrose CL-4B, Ultragel AcA-54 e hidroxiapatita.	20%	56	Sztajer <i>et al.</i> , 1992
<i>P. expansum</i> DSM 1994	Filtração <i>crossflow</i> , precipitação com sulfato de amônio e phenyl-Sephrose	219	25	Stocklein <i>et al.</i> , 1993
<i>P. citrinum</i>	Micelas reversas AOT em isooctano e coluna de phenyl-Sephrose.	26,4%/810	33	Krieger <i>et al.</i> , 1997
<i>P. citrinum</i>	Precipitação com sulfato de amônio, coluna de Superose 6 e HIC em phenyl-Sephrose.	15,2%/379	33	Krieger <i>et al.</i> , 1999
<i>P. chrysogenum</i>	Ultrafiltração, phenyl-Sephrose, Mono Q HR 5/5 e coluna PD-10 em Sephadex G-75.	44%/30	40	Ferrer <i>et al.</i> , 2000
<i>P. cyclopium</i>	Precipitação com sulfato de amônio, Sephadex G-75, DEAE-Sephadex e Sephadex G-75 novamente.	30%/590	37	Chahinian <i>et al.</i> , 2000
<i>R. japonicus</i> NR 400	Hidroxiapatita, octyl- Sepharose e Sephacryl S-200.	31%/93	30	Suzuki <i>et al.</i> , 1986
<i>R. oryzae</i>	Precipitação com acetona (80%) e Sephadex G-100.	64%/160		Razak <i>et al.</i> , 1997
<i>R. delemar</i>	Cromatografia de afinidade com ácido oléico e CM-Sephadex.	30%/10,3	30,3	Haas <i>et al.</i> , 1992
<i>R. arrhizus</i>	Fracionamento com sulfato de amônio e Sephadex G-100.	42%/720	67	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 1999
<i>R. chinensis</i>	CM-Celulose C-500, etér Toyopearl 650 M, Super Q Toyopearl e CM-Celulose C-500 novamente.	27,6%	28,4	Yasuda <i>et al.</i> , 2000
<i>R. oryzae</i>	Fracionamento com sulfato de amônio, sulfopropil-Sephrose, Sephadex G-75 e sulfopropil-Sephrose novamente.	22%/1260	32	Hiol <i>et al.</i> , 2000

Fonte: Saxena *et al.*, 2003.

1.5 Aplicações industriais das lipases e mercado

As lipases apresentam importante potencial biotecnológico. Dentre suas diversas aplicações industriais destacam-se o uso de lipases: na indústria de detergente, substituindo com vantagem produtos usados para decompor as gorduras, já que são biodegradáveis e reduzem o uso de água durante o enxágüe (Grant; Mwatha; Jones, 1990); na produção de biopolímeros, onde as lipases são usadas como biocatalisadores (Gross; Kalra; Kumar, 2001), dispensando o uso de temperaturas altas, reduzindo assim gastos excessivos com energia (Jansen; Vaidya; Halling, 1996); na produção de biodiesel, atuando como catalisador do processo de transesterificação de óleos vegetais a ésteres (Iso *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2001, Parawira, 2009); na indústria alimentícia, substituindo produtos químicos na diminuição da turbidez de sucos de frutas, e para conferir sabor e aroma a queijos (Zalacain *et al.*, 1995); na produção de complementos nutricionais, como os ácidos graxos poliinsaturados pertencentes às famílias ômega 3 e 6; na indústria de cosméticos para a produção de surfactantes e novos aromas, que são os principais componentes para a fabricação de perfumes e cosméticos (Pandey *et al.*, 1999).

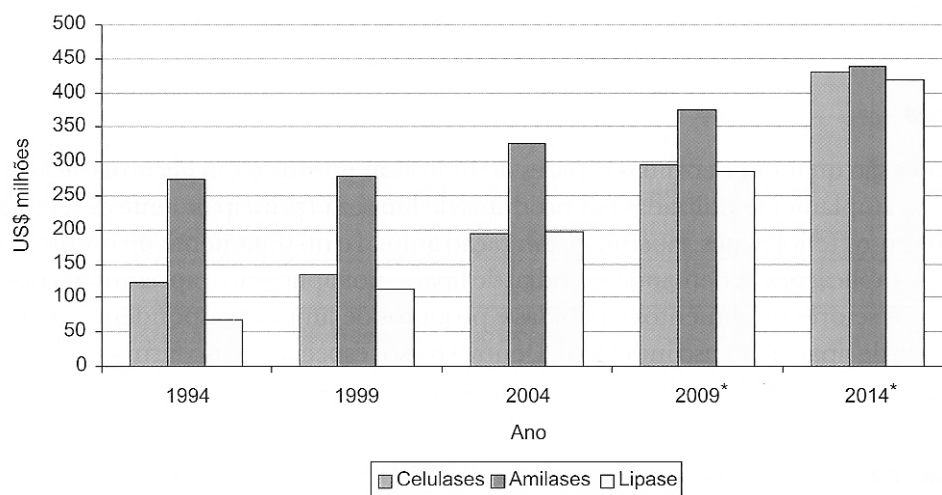


Figura 10. Demanda mundial de celulases, amilases e lipases. Fonte: Estudo World Enzymes to 2009, Freedonia Group Incorporated (Sá-Pereira *et al.*, 2008). *Projeção.

A demanda mundial de lipases vem aumentando ao longo dos anos (**Tabela 3**). Estima-se que em 2014 o consumo de lipase se equipare ao de amilase e celulase (**Figura 10**). Os setores de alimentos e bebidas e produtos de limpeza respondem por 80% da demanda de lipase para uso industrial, enquanto que para aplicações especiais, 60% das lipases são consumidas pela indústria farmacêutica. A projeção para o crescimento anual da demanda mundial de lipases é da ordem de 7,9%, crescimento este impulsionado pelos

avanços em biocatálise, produtos farmacêuticos, biodiesel e óleos e gorduras (Sá-Pereira *et al.*, 2008) .

Tabela 3. Demanda mundial de lipases por aplicação (em milhões de dólares) (Sá-Pereira *et al.*, 2008).

	1994	1999	2004	2009*	2014*
Industrial	67	114	196	286	419
Alimentos e bebidas	30	60	126	185	275
Produtos de limpeza	20	30	40	55	75
Outros mercados	17	24	30	46	69
Especial	23	41	54	79	111
Farmacêutico	13	25	33	47	63
Outros mercados	10	16	21	32	48
Demanda mundial de enzimas	1990	2670	3700	5080	7120
% Lipase	4,5	5,8	6,8	7,2	7,4

Fonte: Estudo World Enzymes to 2009, Freedonia Group Incorporated

*Projeção.

2. OBJETIVOS

O trabalho teve por objetivo a prospecção de fungos filamentosos potencialmente produtores de lipases. Do fungo selecionado, *Beauveria brongniartii*, objetivou-se a produção de lipases em fermentação submersa e fermentação em estado sólido visando à maior produção dessas enzimas para purificação e imobilização. Objetivou-se também a caracterização de parâmetros físico-químicos, constantes cinéticas e propriedades intrínsecas das lipases parcialmente purificadas por métodos cromatográficos convencionais e das lipases imobilizadas em suporte DEAE-Celulose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e isolamento dos fungos

Os fungos foram coletados no depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP. As coletas foram realizadas em solo e em serragem usada para cobrir o solo. Foram coletadas duas amostras de solo e duas de serragem. O local foi geo-referenciado por GPS - “Global Positioning Systems” etrex, Garmin, 12 canais, onde foi determinada a latitude, longitude, precisão do aparelho e altitude. Foi registrada a data, hora e temperatura ambiente do momento da coleta, de acordo com a ficha padrão para coletas e registro BIOTA/FAPESP, disponível no site: <http://sinbiota.cria.org.br>.

Para isolamento dos fungos filamentosos, a metodologia adotada foi a de plaqueamento com diluições sucessivas, onde suspensões de solo e de serragem, contendo traços de pentabiótico veterinário, foram inoculadas em distintas diluições em placas de Petri contendo meio de cultura constituído por ágar bacteriológico 2% e farinha de aveia 4%. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperaturas de 30°C e 40°C. Em seguida, foi realizado o processo de isolamento dos diferentes fungos, de acordo com observação macroscópica, quanto à cor dos esporos, mudança de cor do meio de cultura, provavelmente devido à formação de metabólitos secundários e textura das hifas (liso, enrugado, hifas aéreas, etc.).

3.2 Manutenção dos fungos em laboratório

A manutenção rotineira dos fungos em laboratório foi realizada em tubos de cultura estéreis contendo 10 mL de meio de aveia sólido inclinado. Foram realizados repiques periódicos mantendo-se os fungos em estufa a 30° e 40°C, por aproximadamente dez dias. Em seguida, as cepas foram conservadas em geladeira por um período de até 30 dias.

A manutenção de todo o acervo de fungos isolados foi realizada em sílica gel. Para tanto, 1,2 mL de uma suspensão de esporos preparada em 5 mL de solução de leite Molico desnatado (20g/100 mL de água deionizada) foram misturados a 6 g de silicagel branca 1-4 mm contida em tubos de ensaio (16 x 100 mm) vedados com rosca. Dois tubos foram armazenados para cada fungo. Todos os passos foram conduzidos de forma asséptica.

3.3 Screening de fungos filamentosos produtores de lipases

Para a pré-seleção os fungos isolados das amostras de solo foram inoculados em meio sólido contendo tributirina 1% e em meio sólido contendo óleo de oliva 1%. Os microrganismos foram observados por até 10 dias de incubação a 30° e 40°C. Foram selecionados os fungos que apresentaram boa taxa de crescimento nesses meios.

As cepas selecionadas foram inoculadas em meio líquido Vogel (Vogel, 1964) – cuja composição está descrita no item 3.5.3 – suplementado com óleo de oliva 1% como fonte de carbono e incubadas a 30° e 40°C, a 100 rpm. O filtrado e o extrato bruto micelial foram submetidos a ensaios enzimáticos para determinar a atividade lipolítica. O fungo com maior atividade lipolítica extracelular e intracelular, *Beauveria brongniartii*, foi escolhido para o prosseguimento desse estudo.

3.4 Identificação do fungo bom produtor de lipases

O fungo selecionado foi identificado no Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, e por biologia molecular utilizando o RNA ribossômico 28S (Ninet *et al.*, 2003).

A identificação molecular da espécie de fungo selecionada foi realizada pela Dra. Jenny Rachid Cursino dos Santos, no Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, cuja responsável é a Prof^a. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi. O fungo foi identificado como *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch 1926 (anamórfico de *Cordyceps brongniartii* Shimazu 1989).

O método empregado para a identificação das espécies se baseou na análise da sequência nucleotídica de genes ribossomais (rDNA), em especial as regiões espaçadoras ITS (Internal Transcribed Spacer Sequence). A análise da região ITS vem sendo usada como importante ferramenta molecular para estudos que objetivam, principalmente, a descrição das comunidades microbianas de diferentes nichos ecológicos e a caracterização de grupos taxonômicos específicos (Bertini *et al.*, 2006; Ciardo *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008).

Como previamente descrito por Henry, Iwen e Hinrichs (2000), fragmentos de DNA de aproximadamente 600 pares de bases correspondendo à região do genoma entre ITS1-5.8S-ITS2 (entre 18S e 25S do rDNA) foram obtidos por PCR (Polymerase Chain Reaction) com primers específicos (primer-ITS1 e primer-ITS4). O produto amplificado

foi seqüenciado em seqüenciador automático (ABI Prism 377, Perkin Elmer) usando-se dois outros primers adicionais (4 primers-: ITS1, ITS2, ITS3 e ITS4) e o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit. As seqüências obtidas foram comparadas com outras previamente descritas na literatura e disponíveis em bancos de dados públicos (NCBI; National Center of Biothecnology Information; GeneBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O alinhamento múltiplo foi realizado através do aplicativo CLUSTAL W para a avaliação da similaridade entre as seqüências (Thompson; Higgins; Gibson, 1994). A identificação da espécie foi baseada em similaridade superior a 96%

3.5 Fermentação submersa (FSm)

As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução com 10^7 esporos.mL⁻¹ ressuspensos em água deionizada esterilizada, em meio de cultura líquido em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio. Foram testados os meios líquidos Adams (Adams, 1990), Khanna (Khanna; Sundari; Kumar, 1995), Vogel (Vogel, 1964), M5 (Peralta; Terenzi; Jorge, 1990) e SR (Rizzatti *et al.*, 2001), com pH 6,0. Os meios foram incubados a 30° ou 40°C, sob agitação orbital a 100 rpm, por 96 horas ou por diferentes períodos, conforme determinado para cada experimento.

3.5.1. Meio de cultura Adams

Peptona	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,05 g
Fonte de Carbono	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.2. Meio de cultura Khanna

Solução de sais de Khanna [20X]	5 mL
Extrato de levedura	0,1 g
Fonte de Carbono	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.2.1. Solução de sais de Khanna

NH ₄ NO ₃	2,0 g
KH ₂ PO ₄	1,3 g

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,362 g
KCl	0,098 g
ZnSO ₄ . H ₂ O	0,007 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,0138 g
FeCl ₃ . 6 H ₂ O	0,0066 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,0062 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.3. Meio de cultura Vogel

Solução de biotina	20,0 µL
Solução de sais de Vogel [50X]	2,0 mL
Extrato de levedura	0,75 g
Peptona	0,75 g
Fonte de Carbono	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.3.1. Solução de biotina

Biotina	5,0 mg
Etanol 50%	100 mL

Esta solução deve ser conservada em refrigerador (4° C), sendo válida por 6 meses.

3.5.3.2. Solução de sais de Vogel [50X]

Citrato de sódio pentahidratado	150,0 g
NH ₄ NO ₃	100,0 g
KH ₂ PO ₄	250,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	10,0 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	5,0 g
Solução de traços de elementos	5,0 mL
Clorofórmio	2,0 mL
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

3.5.3.3. Solução de traços de elementos

Ácido cítrico monohidratado	5,0 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	5,0 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 6 H ₂ O	1,0 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
H_3BO_3	0,05 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
Clorofórmio	0,2 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.4. Meio de cultura M5

Extrato de levedura	0,6 g
Peptona	0,1 g
CaCO_3	0,1 g
NaCl	0,1 g
Acetato de amônio	0,6 g
Fonte de Carbono	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.5. Meio de cultura SR

Solução de sais SR [20X]	5,0 mL
Extrato de levedura	0,45 g
Peptona	0,02 g
Fonte de Carbono	1 mL
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.5.1 Solução de sais SR [20X]

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,24 g
KH_2PO_4	0,3 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1,0 g
Água deionizada q.s.p.	100 mL

3.5.6 Fontes de carbono suplementadas em FSm

Os meios foram suplementados inicialmente com de óleo de oliva 1% a fim de induzir a produção de lipases. Posteriormente, foram testados diferentes óleos – concentração de 1% – como fontes de carbono de origem lipídica. Foram esses: óleos de oliva (*Olea europaea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), pequi (*Caryocar brasiliense*

Camb.), canola (*Brassica napus* L.), nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), mineral, dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood.), milho (*Zea mays* L.) girassol (*Helianthus annuus* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.). A suplementação com D-glucose 0,5% também foi outra variável avaliada.

3.5.7 Fonte de nitrogênio

A influência da fonte de nitrogênio para a produção de lipases também foi avaliada, sendo substituída a fonte de nitrogênio original do meio Khanna – extrato de levedura 0,1% – por peptona, KNO₃, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, CH₃COONH₄ e NH₄Cl 0,1%. O controle foi o meio original com extrato de levedura 0,1%.

3.6 Fermentação em estado sólido (FES)

Para cultivos em substrato sólido foram utilizados 2g de resíduos agroindustriais umedecidos com 4 mL de água deionizada. As culturas foram obtidas mediante inóculo de 1,0 mL de uma solução com 10⁷ esporos.mL⁻¹, ressuspensos em água deionizada e incubados a 30°C, em condições estacionárias por 96 horas ou por diferentes períodos, com umidade relativa de 80%, controlada por higrômetro. Foram utilizados os seguintes resíduos agroindustriais: farelo de trigo (*Triticum* sp.), fibra de trigo, torta de pinhão manso (*Jatropha Curcas*), pinhão manso triturado, torta de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), farinha de centeio (*Secale cereale*), milho (*Zea* sp.) moído, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), farinha de mandioca (*Manihot esculenta*), soja (*Glycine max*) moída e amendoim (*Arachis hypogaea*) moído.

Foi testada a adição de sais no meio de cultura utilizado para FES, para tanto o fungo foi inoculado no substrato farelo de trigo umedecido com 4 mL de água deionizada, água de torneira, sais de Adams (item 3.5.1), solução de sais de Khanna (item 3.5.2.1) ou solução de sais SR (item 3.5.5.1). As culturas foram incubadas a 30°C, 80% de umidade, por 168 horas.

3.6.1 Fontes de carbono indutoras da produção de lipase em FES

Os meios de cultura contendo 2 g de farelo de trigo e 4 mL de água deionizada foram suplementados com diferentes óleos a uma concentração de 5% (v/v) – em relação ao volume de água – a fim de induzir maior produção de lipases. Os óleos testados foram:

óleos de oliva, mamona, pequi, canola, nim, mineral, dendê, soja, macaúba, milho, girassol e gergelim.

3.6.2 Suplementação da cultura com diferentes fontes de nitrogênio

A influência de fontes adicionais de nitrogênio também foi uma variável testada. Para isso foi adicionado à cultura 0,5% (m/v) de extrato de levedura, peptona, KNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ou NH_4Cl , em relação ao volume de água utilizada para umidificar o meio.

3.7 Otimização da produção de lipase através do delineamento fatorial

Experimentos de planejamento fatorial foram utilizados para testar a influência das variáveis óleo de canola (X_1), D-glucose (X_2) e peptona (X_3) na síntese de lipases em FSm; e das variáveis farelo de trigo (X_1), água (X_2) e óleo de nim (X_3) na síntese de lipases em FES.

Optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro repetições de pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 18 experimentos (**Tabela 4**). O valor calculado para os pontos externos foi 1,68. Este valor foi selecionado de modo a se obter um planejamento ortogonal, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si. O planejamento do experimento foi analisado utilizando-se o *software Statistica 8.0*.

As variáveis independentes foram codificadas segundo as relações:

Fermentação submersa

$$X_1 = \frac{\text{CO} - 2}{1}$$

1

$$X_2 = \frac{\text{CG} - 0,5}{0,25}$$

0,25

$$X_3 = \frac{\text{CP} - 0,1}{0,05}$$

0,05

CO = concentração de óleo de canola

CG = concentração de D-glucose

CP = concentração de peptona

Fermentação em estado sólido

$$X_1 = \frac{\text{FT} - 4}{2}$$

2

$$X_2 = \frac{\text{A} - 6}{2}$$

2

$$X_3 = \frac{\text{ON} - 0,4}{0,2}$$

0,2

FT = Farelo de trigo em gramas

A= Volume de água em mL

ON= Volume de óleo nim em mL

Tabela 4. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com variáveis independentes codificadas para a otimização da produção de lipases

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na **Tabela 5**.

As culturas foram incubadas nas condições padronizadas anteriormente. As amostras do extrato bruto extracelular da FSm e as amostras da FES foram usadas para ensaios enzimáticos conforme descrito no item 3.10. A equação para o design experimental foi desenvolvida apenas com os fatores com significância maior que 5%.

Tabela 5. Valores reais das variáveis independentes codificadas para a otimização da produção de lipases

	Xi				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
CO (% v/v)	0,32	1	2	3	3,68
CG (% m/v)	0,08	0,25	0,5	0,75	0,92
CP (% m/v)	0,016	0,05	0,1	0,15	0,184
FT (g)	0,64	2	4	6	7,36
A (mL)	2,64	4	6	8	9,36
ON (mL)	0,064	0,2	0,4	0,6	0,736

3.8 Extração do extrato bruto intracelular e extracelular produzido por FSm

A massa micelial foi obtida após separação do micélio por filtração a vácuo, com auxílio de um funil de Büchner e papel filtro Whatman nº1. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade lipolítica extracelular e para os procedimentos posteriormente descritos. O micélio foi lavado em água deionizada e pesado para obtenção da massa úmida. Para a obtenção do extrato bruto intracelular, o micélio foi macerado com 2 volumes de areia previamente tratada com solução sulfonítrica – ácido sulfúrico:ácido nítrico (1:3) – em gral de porcelana, mantido em gelo. O macerado foi ressuspense em 10 mL de água deionizada e o material foi então centrifugado a 8000 g, durante 15 minutos, a 4°C, para remoção da areia e dos debris celulares. O sobrenadante obtido – o extrato bruto intracelular – foi utilizado para a determinação da atividade lipolítica intracelular e dosagem de proteínas.

3.9 Extração de enzimas extracelulares produzidas por FES

As culturas obtidas por FES foram misturadas a 30 mL de água deionizada e mantidas, sob agitação, por aproximadamente 20 minutos, a 4°C. Em seguida, a suspensão foi filtrada com auxílio de gaze, obtendo-se um filtrado livre de células e um micélio misturado ao substrato. O filtrado foi utilizado para a determinação da atividade lipolítica. O micélio foi descartado.

3.10 Dosagem enzimática

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se o *p*-nitrofenilpalmitato como substrato (Pencreac'h; Baratti, 1996). As condições foram padronizadas como 50 µL do extrato bruto e 450 µL de meio reacional descrito no item 3.10.1.

A reação foi iniciada pela adição de enzima ao meio reacional, sendo a mistura depois incubada em banho-maria inicialmente a 40°C – posteriormente foi determinado como temperatura ótima de reação 60°C. A reação foi interrompida pela adição de 500µL de solução saturada de tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) em diferentes intervalos de tempo. O *p*-nitrofenol liberado por hidrólise, que em pH alcalino forma *p*-nitrofenolato – um composto com coloração amarela – foi quantificado em colorímetro a 405 nm. Controles com a adição da enzima desnaturada (brancos) foram incluídos em cada experimento, determinando-se assim a hidrólise espontânea dos substratos nas condições do ensaio. A unidade (U) está definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol do substrato em um minuto (µmols/min), nas condições de ensaio e a atividade específica em U/mg de proteína. Atividade total foi expressa multiplicando o valor de U/mL pelo volume do extrato.

A atividade enzimática sobre substratos naturais do extrato bruto extracelular produzido por FSm e do extrato bruto produzido por FES também foram avaliadas. As condições foram padronizadas segundo Polizelli *et al.* (2008) com modificações. O ensaio enzimático, com volume final de 7 mL consistiu de 10% de extrato bruto, 50% de óleo vegetal, 30% de tampão citrato-fosfato 100mM (pH5,5) e 10% de Triton X-100. A reação foi incubada a 48°C – conforme estabelecido em nosso laboratório por Gimenez (2010) (comunicação pessoal)¹ – em banho que se movimenta por excursão (140epm), por 120 minutos.

A reação foi finalizada adicionando-se 14 mL de uma solução de acetona:etanol (1:1). Posteriormente foi titulada com NaOH (0,02M) até o pH 9,0. A unidade (U) está definida como sendo a quantidade de enzima necessária para liberar um micromol de ácido graxo em um minuto (µmols/min), nas condições de ensaio.

¹ Informação fornecida por Marita Gimenez em Ribeirão Preto, São Paulo, em 2010.

3.10.1 Meio reacional para a determinação da atividade lipolítica

Solução I:

Goma arábica	0,05 g
Tampão citrato-fosfato (100mM) (McIlvaine, 1921)	90 mL
Triton X-100	250 µL

Solução II:

<i>p</i> -nitrofenilpalmitato	0,030 g
Isopropanol	10 mL

A solução I foi homogeneizada por 25 minutos e estocada a 4°C. A solução II foi homogeneizada por 5 minutos e estocada a -20°C. As duas soluções foram misturadas minutos antes de sua utilização e homogeneizadas por 10 minutos. A solução resultante não pode ser estocada.

3.11 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Às amostras diluídas em água deionizadas (volume final de 200µL) foi adicionado 1 mL de uma solução preparada no momento do uso, composta de carbonato de sódio 2% (m/v) em NaOH 0,1N, sulfato de cobre 1% (m/v) e tartarato de sódio e potássio 1% (m/v), na proporção 100:1:1. Após 15 minutos, acrescentou-se 100uL de Folin Ciocalteau em água deionizada (1:1). Após 30 minutos, foram realizadas as leituras a 660 nm.

A quantificação de proteínas das amostras contendo Triton X-100 foi realizada segundo o método de Cadman, Bostwick e Eichberg (1979) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. Às amostras diluídas em água deionizadas (volume final de 700µL) foi adicionado 1 mL de uma solução preparada no momento do uso, composta de Na₂EDTA 2,5mM, CuSO₄.5H₂O 20,5mM, Na₂CO₃ 8% (m/v) e NaOH 0,4M, na proporção 1:1:1:1. Após 15 minutos, acrescentou-se 500uL de SDS 20%, agitou-se e adicionou-se 100uL de Folin Ciocalteau em água deionizada (1:1). Após 15 minutos, foram realizadas as leituras a 500 nm.

A unidade protéica foi definida como mg de proteína por mL de amostra. Proteína total foi expressa multiplicando-se o valor de mg de proteína/mL pelo volume total do extrato.

3.12 Efeito da temperatura e do pH na atividade e estabilidade das lipases à temperatura, ao pH e a solventes orgânicos

Foram realizadas variações no ensaio enzimático referente à temperatura – de 30°C a 80°C – e pH – pH de 3,0 a 11 – de reação para determinar quais as melhores condições do meio reacional para a atividade lipolítica.

A termoestabilidade foi estudada incubando-se o extrato bruto intracelular e o filtrado da FSm e o extrato bruto da FES em diferentes temperaturas (40°, 50°, 60°, 70°C e 80°C) por três horas, retirando-se alíquotas das amostras após 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos de incubação. As alíquotas retiradas foram submetidas a ensaios conforme descrito no item 3.10.

A estabilidade ao pH foi avaliada incubando-se o extrato bruto intracelular e o filtrado da FSm e o extrato bruto da FES em tampão citrato-fosfato (McIlvaine, 1921) em pH de 2,5 a 8,0, por duas horas, na proporção de 1:1 (extrato bruto/tampão). Decorrido o tempo de incubação as amostras foram submetidas a ensaios conforme descrito no item 3.10, substituindo o tampão de reação por tampão acetato de sódio 200 mM, pH 5,5.

A estabilidade a solventes foi determinada incubando-se as amostras em solventes orgânicos, por 24 horas, na proporção 1:1 (extrato bruto/solvente). Os solventes utilizados foram: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol e butanol. A atividade lipolítica residual foi determinada conforme descrito no item 3.10.

3.13 Purificação parcial da lipase extracelular produzida em FSm

Para ensaios de purificação 315 mL de extrato bruto extracelular obtido em condições ideais de cultivo foi ajustado com tampão Tris-HCl (concentração final de 50 mM) para o pH 7,0 e em seguida aplicado em uma coluna de troca aniônica DEAE-Celulose (2,0 x 20 cm) equilibrada em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, em um fluxo de 1,5 mL/min. Foram coletadas frações de 4 mL por tubo, que foram submetidas a ensaios enzimáticos e leitura a 280 nm. Com este procedimento um pico foi retido na DEAE-Celulose, e posteriormente foi eluído com aplicação de um gradiente linear de 200 mL de NaCl (0-1,5 M) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. As frações referentes ao pico de atividade foram reunidas em um “pool”. A fração de lipases (cerca de 80%) que ficou retida na resina foi considerada imobilizada e posteriormente estudada.

Em seguida o “pool” coletado foi aplicado em coluna de interação hidrofóbica Octyl-Sepharose (0,55x11 cm) equilibrada com NaCl 1 M em tampão Tris-HCl 50mM,

pH 7,0, em um fluxo 1,5 mL/min. Foram coletadas frações de 2 mL por tubo, que foram submetidas a ensaios enzimáticos e leitura a 280 nm. Foi aplicado um gradiente reverso descontínuo de 60 mL de NaCl (1,0-0M) em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,0, que, entretanto, não eluiu a amostra. Posteriormente, o pico de atividade lipolítica que permaneceu retido na resina foi eluído com a aplicação de um gradiente linear de Triton X-100 (0-0,5%) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. A fração contendo atividade enzimática foi submetida a SDS-PAGE e PAGE e também a estudos de caracterização. Todos os procedimentos ocorreram em bancada devido à estabilidade demonstrada pelas lipases de *Beauveria brongniartii*.

3.14 Imobilização e purificação da lipase por adsorção ao trocador aniônico DEAE-Celulose

A lipase extracelular de *Beauveria brongniartii*, obtida nas condições ideais de cultivo por FSm, foi submetida a ensaios de imobilização no suporte DEAE-Celulose. O extrato enzimático bruto equilibrado com tampão Tris-HCl pH 7,0, concentração final de 50mM, foi eluído no suporte de interação iônica DEAE-Celulose, também equilibrado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, na proporção de 1g de suporte para cada 10 mL de extrato enzimático. O procedimento foi realizado em temperatura ambiente (cerca de 25°C), sob agitação constante (agitador de rolos), por até 4 horas.

O curso de imobilização foi controlado pela medida de atividade enzimática do sobrenadante em diferentes tempos. A diminuição da atividade enzimática do sobrenadante foi diretamente relacionada com a quantidade de enzima imobilizada no suporte. Decorrido o tempo de interação, o derivado (enzima adsorvida ao suporte) foi lavado duas vezes com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e posteriormente submetido a eluição com NaCl 1 M, 2 M e 5 M, para eluição da fração anteriormente estudada no procedimento de purificação parcial.

O derivado foi novamente lavado duas vezes em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e submetido a eluição com Triton X-100 1%. A lipase que se manteve adsorvida ao suporte e a que foi eluída com Triton foram submetidas a SDS-PAGE.

3.15 Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE)

As eletroforeses em condições não-desnaturantes foram realizadas segundo a metodologia de Davis (1964), para proteínas ácidas. Os géis utilizados tinham a concentração de 7% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2 cm). As amostras foram diluídas em tampão de corrida (Tris-HCl 0,05M e glicina 0,036 M, pH 8,9). Foram adicionados na amostra azul de bromofenol 0,002% (m/v) e glicerol 10% (m/v). Foram aplicados 20µL desta mistura no gel. As eletroforeses foram realizadas no tampão de corrida sob corrente de 50mA. Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilhante Blue.

3.16 Determinação da atividade lipolítica em gel de poliacrilamida (PAGE 7%)

A determinação da atividade lipolítica em gel de poliacrilamida foi realizada segundo Gilbert, Cornish e Jones (1991) com modificações. A eletroforese em condições não desnaturantes (PAGE) foi realizada como descrito anteriormente. Após o término da corrida, os géis foram colocados sobre um gel de agarose 1% (m/v), fundida em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,0, contendo óleo de oliva 5% (v/v), Victória Blue 0,01% (m/v) e Triton X-100 1,5% (v/v) e incubados a 60°C *overnight*. Após o tempo de reação foi possível detectar as bandas protéicas que continham atividade lipolítica por mudança na coloração do gel de agarose, devido à presença do indicador Victória Blue.

3.17 Caracterização enzimática em gel de eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). Os géis utilizados tinham a concentração de 12% de acrilamida e foram polimerizados em placas de vidro (7,2 x 10,2 cm). Foi polimerizado sobre o gel 12% um gel de empilhamento com concentração de 5% de acrilamida. As amostras foram preparadas na proporção de 1:1 em tampão de amostra (glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,002% e Tris 0,12 M, pH 6,75) e aquecidas durante 5 minutos em água fervente. As eletroforeses foram realizadas em tampão composto por Tris 0,025M, glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 40mA e 120V. Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilhante Blue.

Outra metodologia utilizada para eletroforeses em condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida em tubo conforme metodologia descrita por Laemmli (1970) acrescido de uréia. Os géis utilizados tinham a concentração de 10% de acrilamida e uréia 5M e foram polimerizados em tubos de vidro. As amostras foram preparadas como anteriormente acrescido de uréia 8,0M. As eletroforeses foram realizadas em tampão composto por Tris 0,025M, glicina 0,19M e SDS 0,1%, pH 8,3, sob corrente de 16mA. Após a corrida os géis foram corados com Coomassie Brilhante Blue.

3.18 Caracterização físico-química das lipases parcialmente purificadas e do derivado

Depois das etapas de purificação parcial e imobilização, a lipase parcialmente purificada e a imobilizada foram submetidas à caracterização quanto à temperatura e ao pH e efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol. A estabilidade à temperatura foi realizada conforme descrito no item 3.12.

3.18.1 Otimização das condições de reação enzimática através do delineamento fatorial

Para determinar o efeito das variáveis temperatura (X_1) e pH (X_2) sobre a reação enzimática da enzima parcialmente purificada e da enzima imobilizada em DEAE-Celulose utilizou-se experimentos de planejamento fatorial. Para tanto, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro repetições de pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 12 experimentos (**Tabela 6**). O valor calculado para os pontos externos foi 1,414. Este valor foi selecionado de modo a se obter um planejamento ortogonal, onde a matriz de variância e covariância é diagonal e os parâmetros estimados não são correlacionados entre si. O planejamento do experimento foi analisado utilizando-se o *software Statistica 8.0*.

As variáveis independentes foram codificadas segundo as relações:

$$X_1 = \frac{^{\circ}\text{C} - 50}{20}$$

$$X_2 = \frac{\text{pH} - 5,5}{2,5}$$

$^{\circ}\text{C}$ = temperatura de reação ($^{\circ}\text{C}$)

pH = pH de reação

Os níveis utilizados para a codificação das variáveis independentes encontram-se na **Tabela 7**. A equação para o design experimental foi desenvolvida apenas com os fatores com significância maior que 5%.

Tabela 6. DCCR, com variáveis independentes codificadas para a otimização da reação enzimática.

Experimento	X ₁	X ₂
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	+1
4	+1	-1
5	-1,414	0
6	+1,414	0
7	0	-1,414
8	0	+1,414
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Tabela 7. Valores reais das variáveis independentes codificadas para a otimização da reação enzimática

	Xi				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
T (°C)	21,7	30	50	70	78,3
pH	1,96	3,0	5,5	8,0	9,04

3.18.2 Efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade enzimática

Para o estudo do efeito de sais, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da lipase parcialmente purificada e da lipase imobilizada, utilizou-se de soluções de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, NaBr, CuCl_2 , ZnCl_2 , BaCl_2 , NaCl, HgCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , AgNO_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, CaCl_2 , KCl, NH_4F , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , EDTA e β -mercaptoetanol, de modo a se obter concentrações finais de 1,0 mM do composto correspondente na mistura de reação.

3.19 Determinação das constantes cinéticas

As constantes cinéticas (K_m e $V_{m\acute{a}x}$) da lipase parcialmente purificada e da imobilizada foram analisadas conforme os procedimentos gráficos propostos por Hanes (1932) e por Lineweaver e Burk (1934) e através do programa SigrafW (Leone; Degreve; Baranauskas, 1992; Leone *et al.*, 2005). O substrato utilizado foi *p*-nitrofenilpalmitato nas concentrações de 0,395 a 7,11 μmol .

3.20 Análise dos experimentos

Todos os experimentos e ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata. Os experimentos foram analisados com base na média e no desvio padrão. Para os experimentos de superfície de resposta foi aplicada análise estatística ANOVA. Para a análise dos experimentos e representação gráfica foram utilizados os programas Microsoft Office Excel 2007, Origin Pro 8 e STATISTICA 8.0.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento de fungos filamentosos

Com o objetivo de encontrar cepas com capacidade lipolítica foram coletadas duas amostras de solo e duas amostras de serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. As amostras foram plaqueadas por diluições sucessivas conforme descrito em Material e Métodos. De cada amostra e diluição foram feitas duas placas, sendo que uma foi incubada em estufa bacteriológica a 30°C e outra a 40°C, para que se pudessem identificar organismos que fossem capazes de crescer nas diferentes temperaturas. Após 72 horas de crescimento foi possível identificar diferentes colônias, que diferiam por cor, aspectos e textura.

Foram isoladas 36 colônias com características morfológicas distintas (**Figura 11** e **Figura 12**). As colônias isoladas receberam um código de identificação. A tabela abaixo (**Tabela 8**) especifica o código de cada colônia e a temperatura de crescimento.

Tabela 8. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP

Cepa	*T (°C)	Cepa	*T (°C)	Cepa	*T (°C)
USP 1	30	USP 13	30	USP 25	40
USP 2	30	USP 14	30	USP 26	40
USP 3	30	USP 15	30	USP 27	40
USP 4	30	USP 16	30	USP 28	40
USP 5	30	USP 17	30	USP 29	40
USP 6	30	USP 18	30	USP 30	40
USP 7	30	USP 19	30	USP 31	40
USP 8	30	USP 20	30	USP 32	40
USP 9	30	USP 21	30	USP 33	40
USP 10	30	USP 22	30	USP 34	40
USP 11	30	USP 23	30	USP 35	40
USP 12	30	USP 24	40	USP 36	40

* Temperatura de incubação

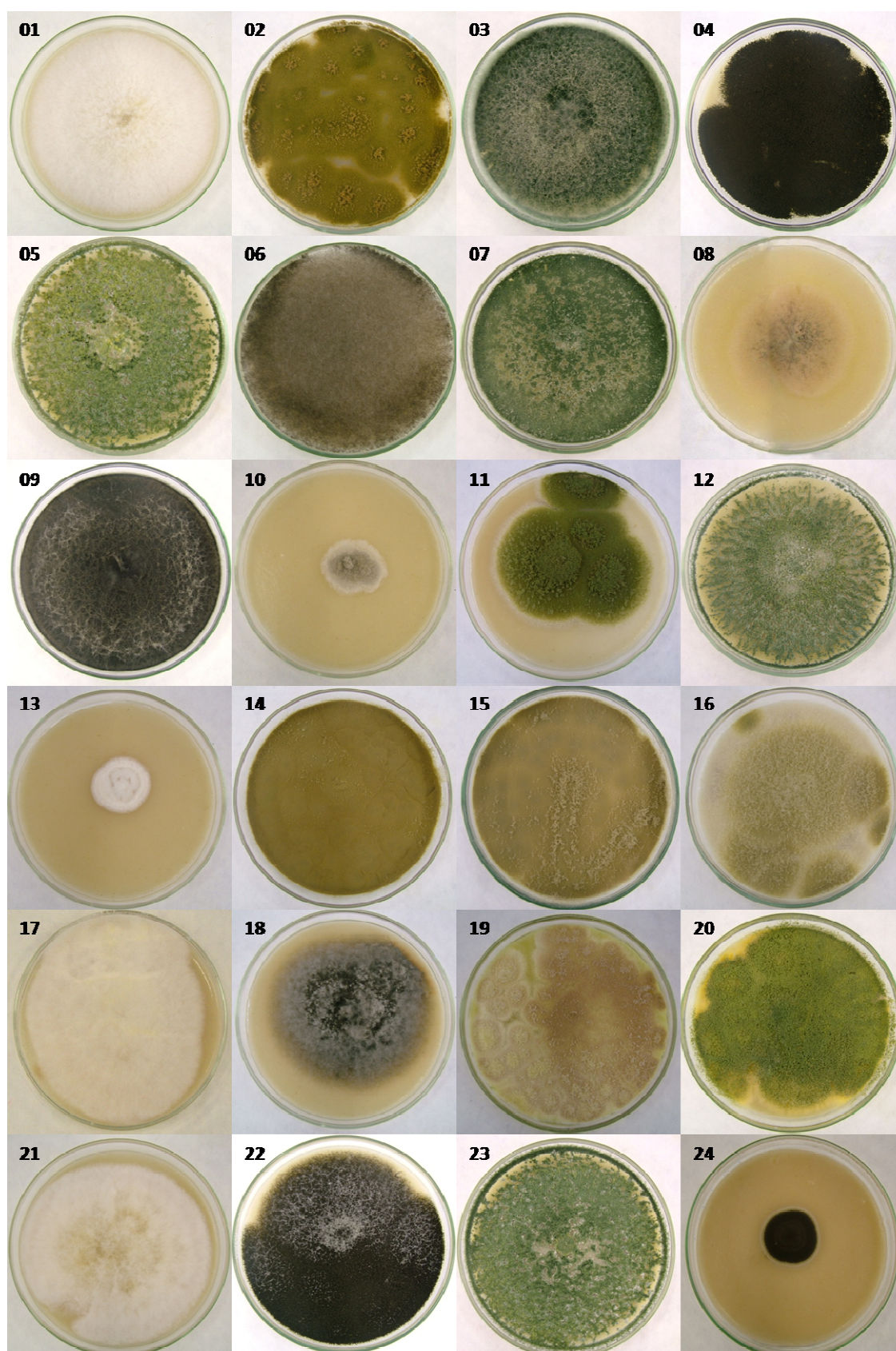


Figura 11. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. (01) a (24) – USP 01 a USP 24. As cepas USP 01 a USP 23 foram incubadas a 30°C e a cepa USP 24 foi cultivada a 40°C, em meio de aveia sólido. Foto: A. C. Vici.

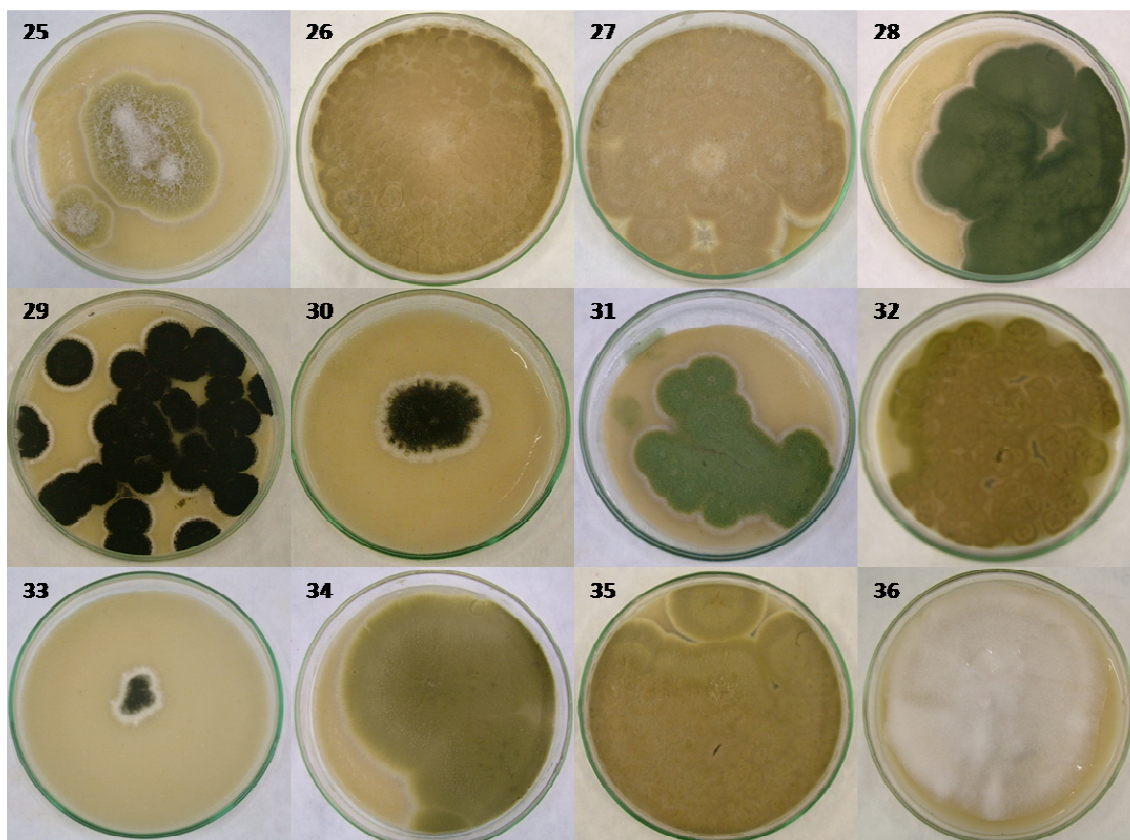


Figura 12. Fungos isolados a partir de amostras de solo e serragem do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. (25) a (36) – USP 25 a USP 36. As cepas foram cultivadas a 40°C em meio de aveia sólido. Foto: A. C. Vici

4.2 Pré-seleção de cepa para a produção de lipases

Com o objetivo de pré-selecionar os microrganismos isolados anteriormente, realizou-se plaqueamento em meio sólido com tributirina e meio sólido com óleo de oliva, conforme descrito em Material e Métodos.

Dos 36 fungos isolados, oito (USP 6, 9, 13, 18, 24, 33, 34 e 36) não cresceram em meio com tributirina e dez (USP 9, 13, 15, 16, 25, 26, 32, 33, 34 e 36) não cresceram em meio com óleo de oliva (**Tabela 9**). Esse resultado revela que dos fungos isolados vários – aqueles que cresceram em meio com óleo de oliva – são capazes de produzir lipases, e podem ser utilizados para estudos de produção dessas enzimas, enquanto outros, os que cresceram em meio com tributirina, são capazes de secretar algum tipo de esterase.

Tabela 9. Teste em placa de Petri para a pré-seleção de cepas produtoras de lipases

Cepa	Meio com tributirina	Meio com óleo de oliva	Cepa	Meio com tributirina	Meio com óleo de oliva
USP 1	+	+	USP 19	+	+
USP 2	+	+	USP 20	+	+
USP 3	+	+	USP 21	+	+
USP 4	+	+	USP 22	+	+
USP 5	+	+	USP 23	+	+
USP 6	-	+	USP 24	-	+
USP 7	+	+	USP 25	+	-
USP 8	+	+	USP 26	+	-
USP 9	-	-	USP 27	+	+
USP 10	+	+	USP 28	+	+
USP 11	+	+	USP 29	+	+
USP 12	+	+	USP 30	+	+
USP 13	-	-	USP 31	+	+
USP 14	+	+	USP 32	+	-
USP 15	+	-	USP 33	-	-
USP 16	+	-	USP 34	-	-
USP 17	+	+	USP 35	+	+
USP 18	-	+	USP 36	-	-

O repique dos fungos foi realizado em meio sólido contendo tributirina 1% e em meio sólido contendo óleo de oliva 1%.

* Os símbolos “+” e “-” representam, respectivamente, as cepas que cresceram e as que não cresceram.

4.3 Screening de fungos produtores de lipases por fermentação submersa

A capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas para o meio de cultivo de alguns fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de fermentação em larga escala, purificação enzimática e técnicas de biologia molecular (Agger *et al.*, 2002; Peixoto, 2004; Trevisan, 2004).

Com o objetivo de identificar espécies de fungos com boa produção de lipases, foi feito o cultivo em FSm, com meio Vogel (Vogel, 1964) suplementado com óleo de oliva

1%. Os meios de cultivo permaneceram 96 horas em agitação a 100 rpm e a temperatura de 30 ou 40°C dependendo do fungo e da temperatura de isolamento. O filtrado e o extrato bruto micelial foram submetidos a ensaios enzimáticos para determinar a atividade lipolítica. Esse tipo de *screening* estima quantitativamente a produção de lipases, usando para ensaio enzimático o substrato sintético *p*-nitrofenilpalmitato como revisto por Gupta *et al.* (2003).

Para esse experimento foram utilizadas as cepas que cresceram em ambas as placas e as que cresceram somente em óleo de oliva do experimento anterior e outras espécies mantidas no cepário de nosso laboratório. Foram usadas nessa seleção as seguintes espécies: *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus*, *Beauveria brongniartii*, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, *Penicillium purpurogenum* e *Trichoderma harzianum*, e as cepas pré-selecionadas USP 01, USP 02, USP 03, USP 04, USP 05, USP 06, USP 07, USP 08, USP 10, USP 11, USP 12, USP 14, USP 17, USP 18, USP 19, USP 20, USP 21, USP 22, USP 23, USP 24, USP 27, USP 28, USP 29, USP 30, USP 31 e USP 35. Os fungos *Aspergillus niveus*, *Humicola grisea* var. *thermoidea*, USP 27, USP 28, USP 29, USP 30, USP 31 e USP 35 foram incubados a 40°C, os demais microrganismos foram incubados a 30°C, característico de mesófilos.

Observando a **Figura 13**, que ilustra a quantificação da proteína total (mg), é possível notar que a cepa USP 19 obteve o maior produção de proteínas, enquanto que USP 35 obteve o menor crescimento dentre as cepas testadas.

Quanto à atividade lipolítica total (**Tabela 10**) é possível observar 8 cepas com atividade lipolítica interessante. Destas uma se destaca, a que foi posteriormente identificada como *Beauveria brongniartii*, por uma somatória de atividade total (atividade intracelular mais a atividade extracelular) de 70,75U. Este microrganismo foi escolhido para a continuidade dos estudos.

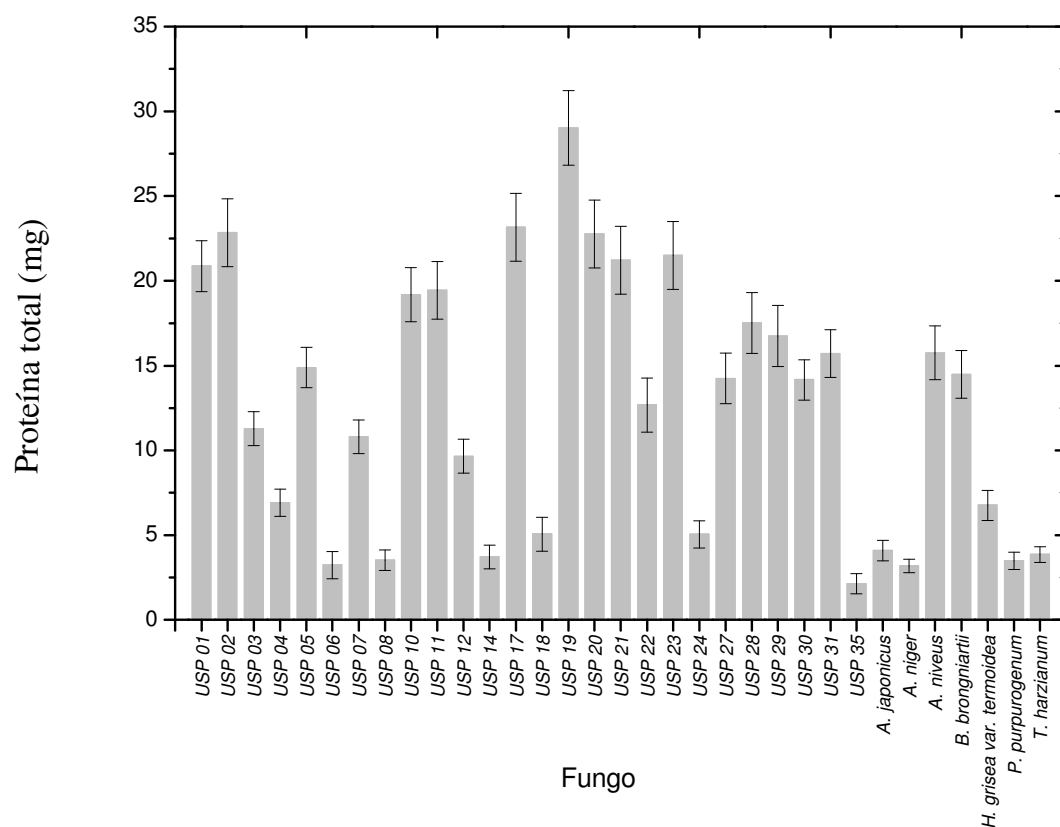


Figura 13. Proteína total (mg) das cepas utilizadas para *screening* de fungos produtores de lipases. Os fungos foram inoculados em meio Vogel, suplementado com óleo de oliva 1%, e incubados por 96h, a 30° ou 40°C, 100 rpm.

Tabela 10. Atividade lipolítica intracelular e extracelular dos fungos submetidos a *screening*.

Fungo	Atividade Intracelular (U total)	Atividade extracelular (U total)	Σ da Atividade
USP 01	ND	0,01 ± 0,002	0,01
USP 02	0,75 ± 0,02	0,33 ± 0,04	1,08
USP 03	ND	0,01 ± 0,002	0,01
USP 04	ND	0,01 ± 0,004	0,01
USP 05	0,32 ± 0,06	0,20 ± 0,02	0,52
USP 06	ND	ND	-
USP 07	ND	ND	-
USP 08	ND	0,27 ± 0,022	0,27
USP 10	ND	0,040 ± 0,006	0,04
USP 11	2,04 ± 0,008	0,02 ± 0,004	2,06
USP 12	0,19 ± 0,012	0,69 ± 0,008	0,88
USP 14	ND	ND	-
USP 17	0,10 ± 0,004	0,20 ± 0,022	0,30
USP 18	0,32 ± 0,084	0,22 ± 0,008	0,54
USP 19	23,63 ± 0,084	0,49 ± 0,068	24,12
USP 20	12,81 ± 0,146	0,14 ± 0,006	12,95
USP 21	ND	ND	-
USP 22	22,61 ± 0,18	9,00 ± 0,064	31,61
USP 23	0,45 ± 0,012	0,97 ± 0,04	1,42
USP 24	ND	ND	-
USP 27	0,16 ± 0,04	0,59 ± 0,062	0,75
USP 28	5,42 ± 0,12	23,77 ± 0,288	29,19
USP 29	5,94 ± 0,16	0,47 ± 0,042	6,41
USP 30	6,30 ± 0,12	1,61 ± 0,082	7,91
USP 31	0,16 ± 0,068	0,13 ± 0,028	0,29
USP 35	ND	0,06 ± 0,004	0,06
<i>A. japonicus</i>	11,42 ± 0,164	20,91 ± 0,14	32,33
<i>A. niger</i>	9,61 ± 0,12	20,35 ± 0,24	29,96
<i>A. niveus</i>	0,42 ± 0,006	0,50 ± 0,014	0,92
<i>B. brongniartii</i>	34,68 ± 0,84	36,07 ± 0,62	70,75
<i>H. grisea</i> var. <i>termoidea</i>	11,07 ± 0,26	23,38 ± 0,42	34,45
<i>P. purpurogenum</i>	17,63 ± 0,12	1,11 ± 0,12	18,74
<i>T. harzianum</i>	ND	27,08 ± 0,46	27,08

ND significa atividade lipolítica não detectada.

4.4 Efeito da temperatura sobre o crescimento do fungo e sobre a produção de lipases em FSm

A temperatura de crescimento dos fungos abrange uma larga faixa, havendo espécies psicrófilas, mesófilas e termófilas (Carlile; Watkinson, 1994). *Beauveria brongniartii* é uma espécie de fungo mesófilo, entretanto para saber a temperatura ideal de crescimento deste microrganismo, foram realizados repiques em placas de Petri com meio de aveia. As placas foram incubadas em temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C, por 120 horas. O fungo apresentou maior crescimento quando incubado a 25°C, entretanto, apresentou crescimento considerável quando incubado a 30°C, mas praticamente não cresceu quando incubado a 40°C (**Figura 14**).

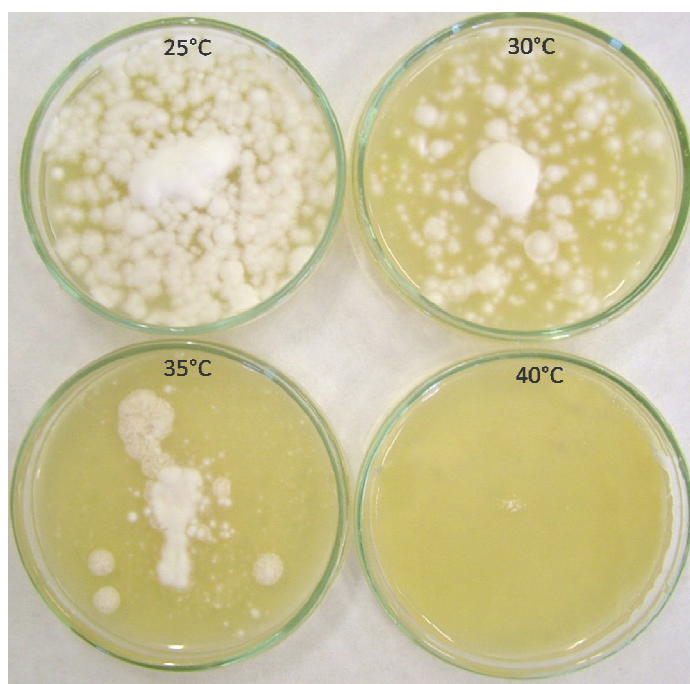


Figura 14. Crescimento de *B. brongniartii* a 25°, 30°, 35° e 40°C. Foi feito repique em placas de Petri contendo meio de aveia. O fungo foi incubado por 120 h.

Foi realizado também um estudo sobre o efeito da temperatura de crescimento sobre a produção de lipases em fermentação submersa. Para tanto, o fungo foi inoculado em meio Vogel (Vogel, 1964) suplementado com óleo de oliva 1%, incubado por 96 horas, 100 rpm, nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C.

Os resultados mostram que, em FSm, *B. brongniartii* apresentou maior produção protéica quando incubado a 25° e 30°C, o que se pode perceber pelos resultados de proteínas totais (**Figura 15.A**). Quanto a produção lipolítica (**Figura 15.B**), esta foi semelhante nos cultivos a 25° e 30°C, para ambos os extratos brutos, intra e extracelulares.

Quando crescido a 35°C, *B. brongniartii* secretou aproximadamente 50% das lipases extracelulares detectadas nos cultivos a 30°C, e aproximadamente 25% das lipases intracelulares. A 40°C não se observou produção de lipases nas condições determinadas para o experimento.

Os delineamentos experimentais adotados a partir deste resultado para a produção de lipases por *B. brongniartii* referem-se à temperatura de 30°C, refletindo os procedimentos adotados anteriormente e similaridades de níveis enzimáticos detectados a 25°C.

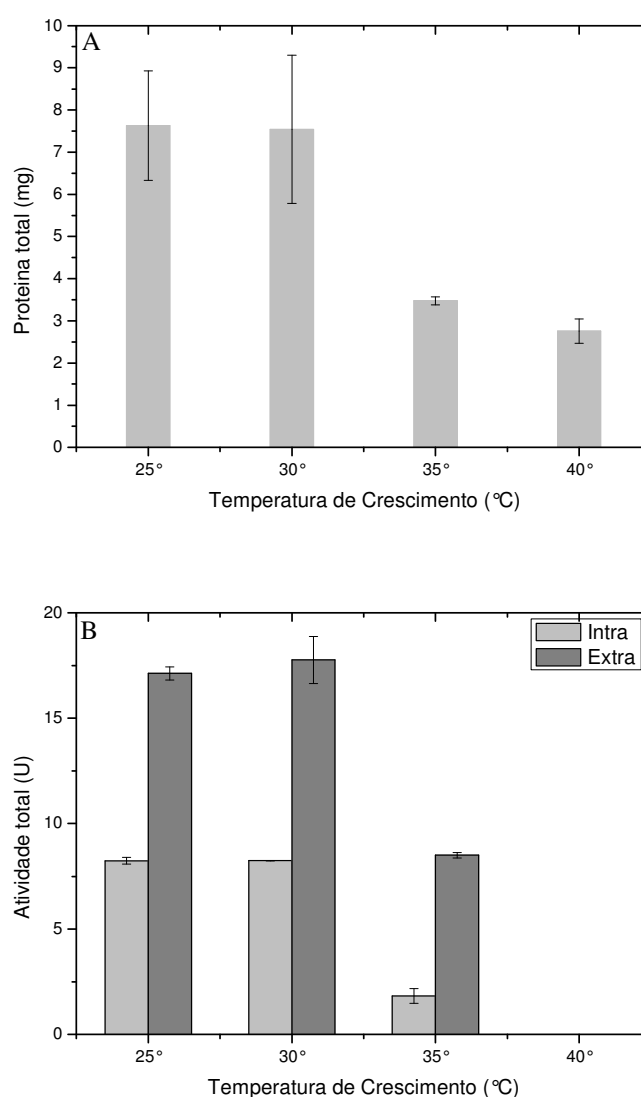


Figura 15. Efeito da temperatura de incubação na produção de proteínas (A) e na produção de lipases (B) intra (cinza claro) e extracelulares (cinza escuro) por *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em meio Vogel suplementado com óleo de oliva 1% e incubado por 96 h, a 100 rpm, nas temperaturas de 25°, 30°, 35° e 40°C.

4.5 Influência de fatores nutricionais e físico-químicos na produção e secreção de lipases de *B. brongniartii* incubado em FSm

Processos industriais necessitam de grandes quantidades da enzima de interesse, que devem também atuar com um máximo de atividade. Vários fatores influenciam na produção e secreção de enzimas pelo fungo, como a composição do meio em que ele cresce, a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio e as condições de cultivo.

4.5.1 Definição do meio de cultura para FSm

Com o intuito de determinar a melhor composição do meio de cultura de crescimento, foram preparados cinco meios de cultura: meio Adams (Adams, 1990), Khanna (Khanna; Sundaro; Kumar, 1995), M5 (Peralta; Terenzi; Jorge, 1990), Vogel (Vogel, 1964) e SR (Rizzatti *et al.*, 2001). Esses meios variam na composição de íons e no tipo e concentração da fonte de nitrogênio. Os meios de cultura, suplementados com óleo de oliva 1%, foram mantidos por 96 horas em agitação orbital de 100 rpm e a temperatura de 30°C.

A **Figura 16** ilustra os resultados obtidos. Observa-se que *B. brongniartii* se desenvolveu melhor no meio de cultivo Vogel e M5 (**Figura 16.A**). Sobre a atividade lipolítica, os meios de cultura SR e Khanna favoreceram a atividade lipolítica intracelular, sem nenhuma diferença estatisticamente significativa. Enquanto que, o meio de cultivo Khanna favoreceu a secreção de lipases, comparado a todos os meios de cultura utilizados (**Figura 16.B**).

Analisando esses resultados estipulou-se o meio de cultura Khanna, como meio para cultivo em fermentação submersa para a realização dos próximos experimentos.

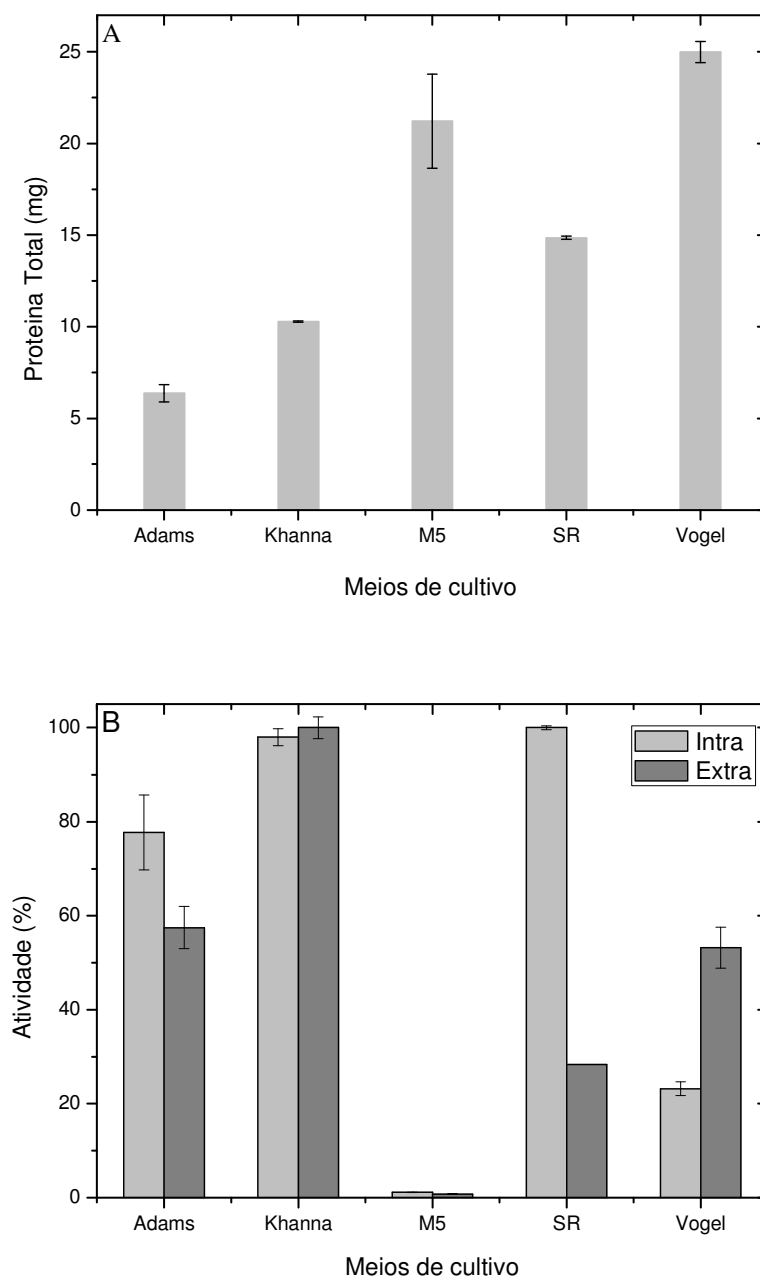


Figura 16. Determinação do meio de cultura para cultivo do fungo *B. brongniartii*. (A) Proteínas totais (mg); (B) Atividade lipolítica (%) intra (cinza claro) e extracelulares (cinza escuro). O fungo foi cultivado em meios Adams, Khanna, Vogel, M5 e SR, suplementado com óleo de oliva 1%, por 96 h, a 30°C, 100 rpm. Foi considerado como 100% de atividade o extrato com maior atividade lipolítica.

4.5.2 Produção de lipases em FSm em função do tempo e das condições físicas de cultivo

Nessa fase decidiu-se investigar a produção e secreção de lipases por *B. brongniartii* em relação ao tempo e as condições físicas de cultivo, uma vez que o tempo de incubação de um microrganismo e o estado de aeração do meio possui uma elevada influência na produção de enzimas. A incubação por um curto período pode não resultar na produção máxima da enzima de interesse. Da mesma forma, cultivos por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes, levando a um declínio da produção enzimática (Pelczar; Chan; Krieg, 1996) além da morte celular. Na literatura, a maioria dos fungos que produz lipases é cultivada sob agitação (Ginalska; Bancerz; Kowalska-Kornilowicz, 2004; Bancerz *et al.*, 2005) dada a natureza da enzima.

Para a realização desse experimento o fungo foi inoculado em meio Khanna suplementado com óleo de oliva 1%. Parte das culturas foi incubada em condições estáticas em estufa bacteriológica a 30°C e parte em incubadora com agitação (100 rpm) a 30°C. Foram retiradas culturas em crescimento a cada 24 horas de incubação, por 10 dias, totalizando 240 horas. O filtrado das culturas e os sobrenadantes miceliais foram submetidos a ensaios enzimáticos conforme padronizado.

O fungo *B. brongniartii* obteve maior produção de proteínas (**Figura 17.A**) quando cultivado sob agitação durante todo o período de incubação. A produção máxima de proteína se deu com 144 horas de crescimento. Em crescimento estático, a maior produção de proteínas se deu com 168 horas de incubação.

Quanto à produção de lipases (**Figura 17.B**) observa-se que o fungo teve maior secreção de lipases com 72 horas de incubação, sob agitação. Enquanto que a atividade intracelular foi maior com 96 e 120 horas de incubação, também sob agitação. Entretanto, com 72 horas de incubação, sob agitação, a atividade intracelular também foi considerável, comparado aos tempos de 96 e 120 horas. A maior secreção de lipases em cultivo estático ocorreu com 120 horas, mas representou cerca de 50% da secreção máxima em cultivo agitado. O tempo de incubação de 72 horas, em condição de agitação orbital de 100 rpm, foi padronizado para os próximos experimentos.

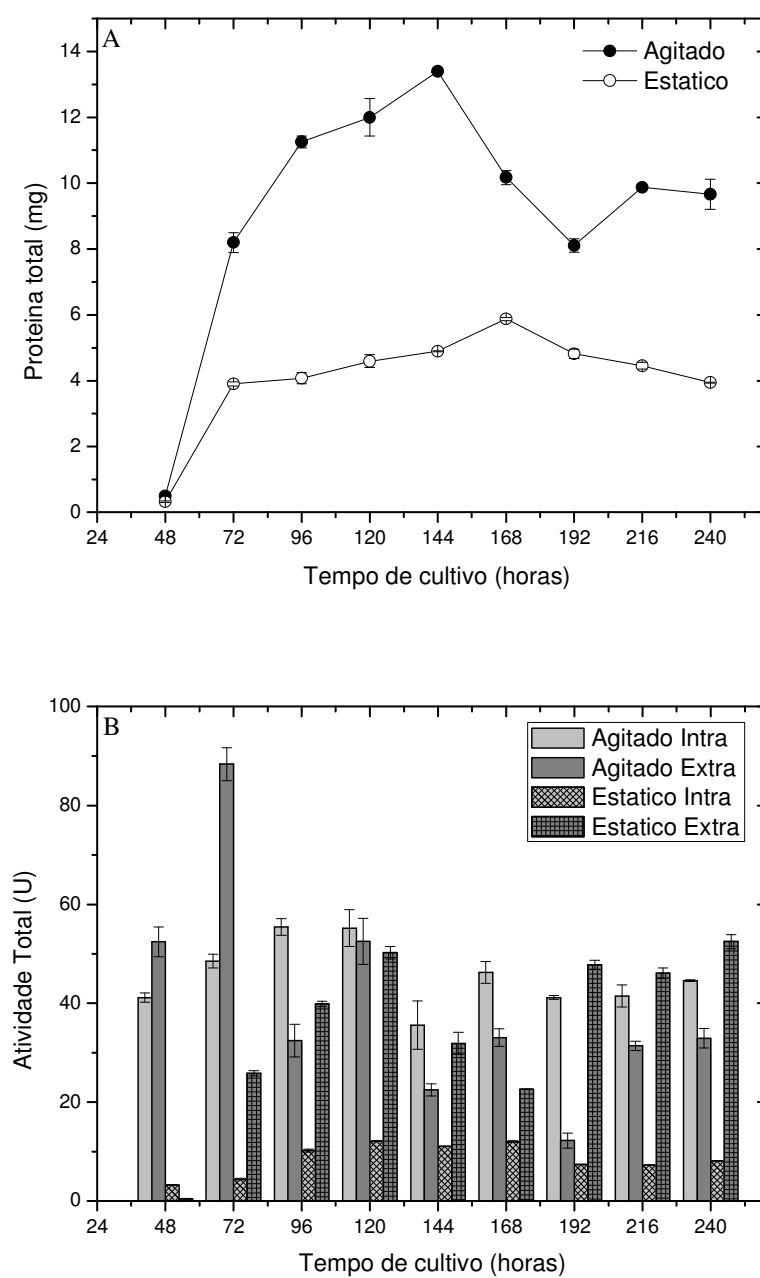


Figura 17. Proteína total (A) e atividade lipolítica (B) em função do tempo de crescimento em horas e da condição de cultivo. O fungo *B. brongniartii* foi inoculado em meio Khanna suplementado com óleo de oliva 1%, e incubado por até 10 dias, a 30°C, em condição estática ou agitado orbitalmente a 100 rpm.

4.5.3 Efeito da fonte de nitrogênio sobre o crescimento de *B. brongniartii* e sobre a produção de lipases em FSm

A fonte de nitrogênio, assim como a fonte de carbono, influenciam tanto no crescimento como na produção enzimática. Com a finalidade de determinar a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases, testou-se a suplementação do meio de cultivo com diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio.

Para a realização desse experimento o fungo foi inoculado em meio Khanna suplementado com óleo de oliva 1%. O extrato de levedura que compõe originalmente o meio foi substituído por peptona, nitrato de potássio, nitrato de amônio, sulfato de amônio, acetato de amônio ou cloreto de amônio, na concentração de 0,1%, conforme a composição original do meio. O meio com extrato de levedura foi usado como controle. As culturas foram incubadas a 30° C e 100 rpm por 72 horas.

Os resultados obtidos (**Figura 18**) demonstram que *B. brongniartii* produziu maior concentração de proteínas intracelulares (**Figura 18.A**) com as fontes de nitrogênio orgânicas, extrato de levedura, peptona e acetato de amônio, sem diferenças estatisticamente significativas. Resultado semelhante foi obtido para a produção de lipases (**Figura 18.B**). O fungo teve uma produção intracelular desta enzima ligeiramente maior em meio contendo acetato de amônio, comparado as outras duas fontes orgânicas de nitrogênio. Entretanto, a maior produção de lipases extracelular se deu em meio suplementado com peptona, cuja atividade foi aproximadamente 5% maior que o controle (extrato de levedura). Apesar de essa diferença não ser muito grande optou-se por substituir a fonte de nitrogênio original do meio por peptona.

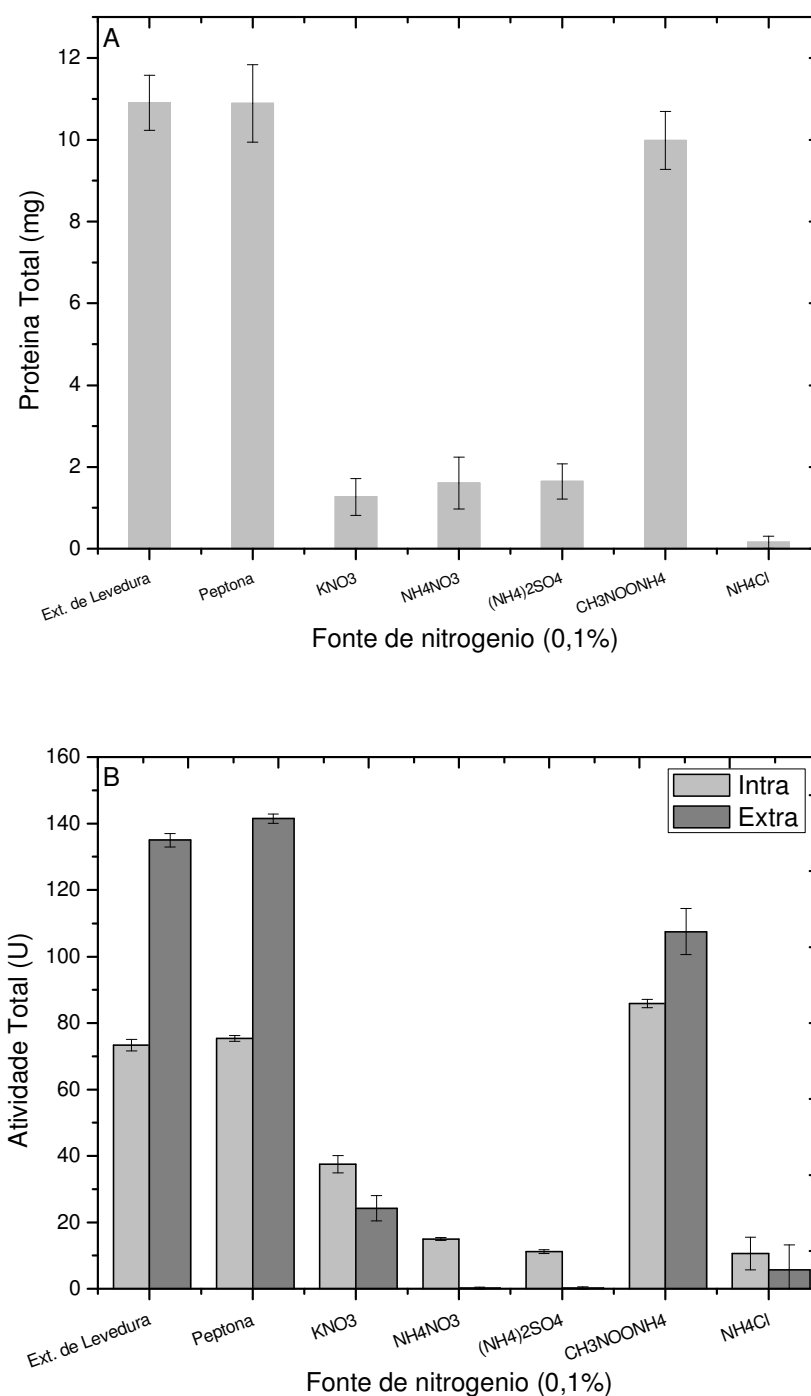


Figura 18. Efeito da fonte de nitrogênio na produção de proteínas (A) e de lipases (B) por *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em meio Khanna suplementado com óleo de oliva 1% e 0,1% de fonte de nitrogênio.

4.5.4 Efeito de fontes de carbono indutoras da produção de lipases produzidas por FSm

A fonte de carbono é um componente do meio de cultura que tem grande influência na produção enzimática, pois é ela que induz ou inibe a produção e secreção de determinadas enzimas. A fonte de lipídios influencia tanto no crescimento do microrganismo como na indução da produção de lipases. Óleos de origens diferentes apresentam composições distintas de lipídios. Objetivando testar a influência de diferentes óleos como fonte de carbono e indutor da produção de lipases pelo fungo estudado, realizou-se um experimento utilizando doze óleos de origens diferentes nos meios de cultura.

Foram utilizados óleos de oliva (*Olea europaea* L.), mamona (*Ricinus communis* L.), pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), canola (*Brassica napus* L.), nim (*Azadirachta indica* A. Juss.), mineral, dendê (*Elaeis guineensis* Jacq.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lood.), milho (*Zea mays* L.) girassol (*Helianthus annuus* L.) e gergelim (*Sesamum indicum* L.). Os meios de cultura foram preparados como citado em Material e Métodos e foram complementados com 1% de cada um dos doze tipos de óleos. As culturas foram incubadas a 30°C, 100 rpm.

Comparando com os resultados obtidos quando incubado em meio suplementado com óleo de oliva (controle) (**Figura 19**) observa-se que o fungo *B. brongniartii* teve maior produção de proteínas (**Figura 19.A**) em meio contendo óleo de pequi, dendê, nim, girassol, mamona, gergelim e soja. Observando-se a atividade lipolítica (**Figura 19.B**) percebe-se que a atividade intracelular foi maior que o controle na maioria dos meios, exceto naquele complementado com óleo mineral 1%. Quanto à atividade extracelular (**Figura 19.B**), ela foi maior que o controle apenas quando cultivado em meio contendo óleo de canola 1%. Para os próximos experimentos padronizou-se o uso de óleo de canola como fonte de carbono indutora da produção de lipases.

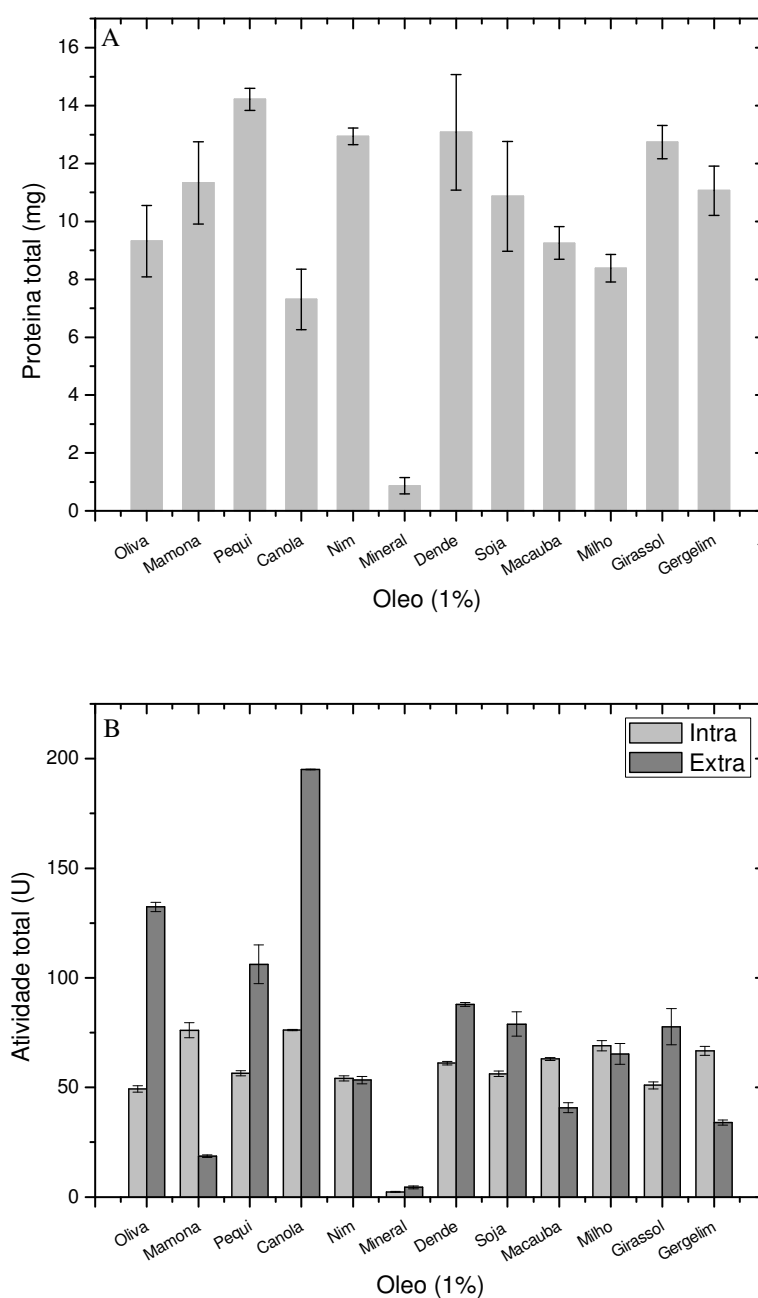


Figura 19. Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção de lipases pelo fungo *B. brongniartii* em FSm. (A) Proteína total (mg) e (B) Atividade total (U) em função do tipo de óleo usado para suplementar o meio de cultivo.

4.5.5 Adição de D-glucose 0,5% associada a diferentes fontes de carbono indutoras da produção de lipase em FSm

Outras fontes de carbono, como carboidratos, podem ser adicionadas ao meio de cultura para induzir maior crescimento do microrganismo. A D-glucose é uma fonte de energia facilmente assimilável pelos microrganismos. A adição desse açúcar ao meio de

cultivo associada a um óleo objetiva aumentar a massa micelial e com isso melhorar a produção de lipases.

Com a finalidade de confirmar essa hipótese realizou-se um experimento em que foi adicionado D-glucose 0,5% e um óleo 1,0% aos meios de cultura líquidos. Com base no experimento anterior foram selecionados diferentes tipos de óleos vegetais: óleo de canola, dendê, oliva e pequi. O controle desse experimento foi realizado em meio de cultura suplementado apenas com óleo de canola 1%.

O fungo foi incubado por 144 horas, a 30°C e 100 rpm. Foram retiradas alíquotas de 2 mL do meio de cultura a cada 24 horas, com a finalidade de observar em qual tempo de cultivo ter-se-ia a melhor produção e secreção de lipases nessas condições. As alíquotas foram utilizadas para dosar a atividade lipolítica extracelular dos fungos e proteínas.

Como resultado (**Figura 20**) observou-se que houve nítido aumento da atividade específica quando o meio de cultura foi suplementado com D-glucose 0,5%, comparado com o controle, o que confirma a hipótese de que o aumento da massa micelial leva ao aumento da produção de lipases. O fungo *B. brongniartii* teve maior atividade lipolítica com 72 horas, em meio de cultura suplementado com D-glucose 0,5% e óleo de canola 1% em comparação aos outros óleos.

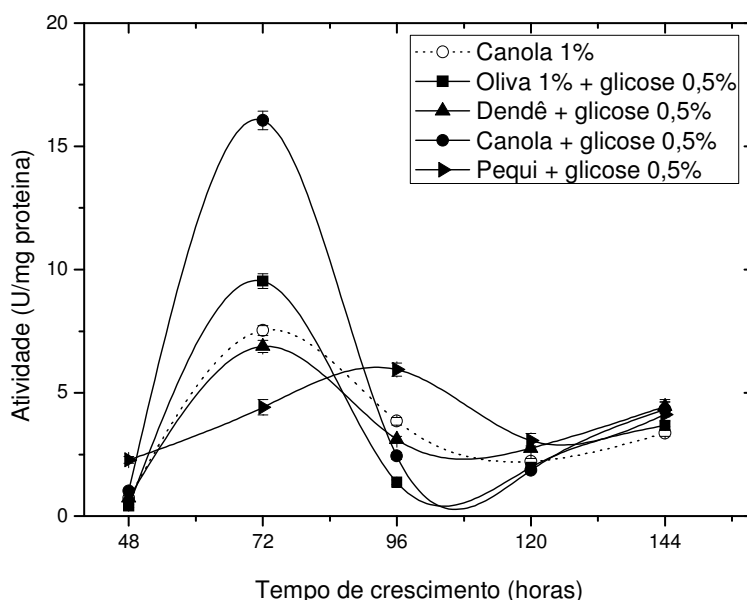


Figura 20. Efeito da adição de D-glucose 0,5% ao meio de cultura, suplementado com diferentes fontes de carbono, sobre a produção de lipases de *B. brongniartii*. Atividade específica extracelular em função do tempo de cultivo (horas). O meio controle foi suplementado apenas com óleo de canola 1% como fonte de carbono.

4.5.6 Avaliação do efeito da concentração de óleo de canola, D-glucose e peptona sobre a produção de lipases em FSm através de planejamento fatorial

Variáveis independentes e contínuas podem ser estudadas em conjunto através de planejamento fatorial. Experimentos delineados em esquemas fatoriais envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores (Rodrigues; Iemma, 2005). Para testar a influência das variáveis óleo de canola (CO), D-glucose (CG) e peptona (CP) na síntese de lipases pelo fungo *Beauveria brongniartii*, em fermentação submersa, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 18 experimentos.

O fungo foi inoculado em meio Khanna, com as variações no meio de cultura descritas em Material e Métodos. As culturas foram incubadas a 30°C, 100 rpm por 72 horas. Os meios foram filtrados e o extrato bruto extracelular foi usado para dosagem enzimática.

Os resultados experimentais foram avaliados através de uma análise de regressão em decorrências de uma equação (**Equação 1**) de produção de lipase (U/mL) em função da concentração de óleo de canola (CO), de D-glucose (CG) e de peptona (CP).

$$\text{Lipase (U/mL)} = 10,54 + 2,10.CO - 2,85.CG - 2,07.(CG)^2 - 2,04.(CP)^2$$

Equação 1

O valor de R e R² para a equação é de 0,9203 e 0,847 respectivamente. O teste F mostrou uma significância de $p < 0,05$, o que indica que o modelo utilizado reflete em uma relação entre os componentes do meio de cultivo na produção de lipase.

O resultado da produção de lipase está representado na **Tabela 11** indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em duplicata. Verifica-se que a maior produção de lipase é destacada no experimento 10, em torno de 17 U/mL.

O valor de p é uma ferramenta que avalia a significância e contribuição de cada parâmetro do modelo equacional estatístico e, a interação entre as variáveis é indicada através desses coeficientes os quais estão indicados na **Tabela 12**. Os valores encontrados na **Tabela 12** sugerem que o efeito do óleo de canola é positivo e significativo a cerca de 0,02 para a produção de lipase, gerando um aumento na produção enzimática. Enquanto que o efeito da D-glucose foi negativo e significativo a 0,004, levando a perda na produção enzimática. É possível observar também um efeito quadrático da concentração de glicose

e da concentração de peptona. O resultado da ANOVA, assim como o teste $F_{\text{calculado}}$ e F_{tabelado} estão apresentados na **Tabela 13**, e demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente válido, pois $F_{\text{calculado}}$ apresenta-se maior que o F_{tabelado} .

Tabela 11. Atividade lipolítica total produzida pelos extratos brutos extracelulares de *B. brongniartii* cultivado em FSm através do DCCR.

Experimento	CO (% v/v)	CG (% m/v)	CP (% m/v)	Atividade (U/mL)
1	-1 (1)	-1 (0,25)	-1 (0,05)	3,79 $\pm$ 0,17
2	-1 (1)	-1 (0,25)	+1 (0,15)	5,96 $\pm$ 0,31
3	-1 (1)	+1 (0,75)	-1 (0,05)	0,30 $\pm$ 0,12
4	-1 (1)	+1 (0,75)	+1 (0,15)	3,04 $\pm$ 0,49
5	+1 (3)	-1 (0,25)	-1 (0,05)	9,87 $\pm$ 0,59
6	+1 (3)	-1 (0,25)	+1 (0,15)	11,93 $\pm$ 0,41
7	+1 (3)	+1 (0,75)	-1 (0,05)	3,03 $\pm$ 0,03
8	+1 (3)	+1 (0,75)	+1 (0,15)	0,70 $\pm$ 0,07
9	-1,68 (0,32)	0 (0,5)	0 (0,1)	7,03 $\pm$ 0,67
10	+1,68 (3,68)	0 (0,5)	0 (0,1)	16,72 $\pm$ 0,12
11	0 (2)	-1,68 (0,08)	0 (0,1)	10,92 $\pm$ 0,97
12	0 (2)	+1,68 (0,92)	0 (0,1)	2,35 $\pm$ 0,08
13	0 (2)	0 (0,5)	-1,68 (0,016)	3,45 $\pm$ 0,17
14	0 (2)	0 (0,5)	+1,68 (0,184)	9,99 $\pm$ 0,26
15	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,1)	10,15 $\pm$ 0,20
16	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,1)	10,03 $\pm$ 0,02
17	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,1)	10,18 $\pm$ 0,57
18	0 (2)	0 (0,5)	0 (0,1)	11,13 $\pm$ 0,75

Os símbolos CO, CG e CP representam, respectivamente, as variáveis concentração de óleo de canola, de D-glucose e de peptona.

Tabela 12. Coeficientes de regressão para a produção de lipase em FSm.

	Coeficiente	Erro Padrão	t	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança +95%
Intercepto	10,54	1,31	8,05	0,000042	7,52164	13,55852
CO (L)	2,10	0,71	2,97	0,018	0,46822	3,74016
CO (Q)	-0,22	0,74	-0,30	0,77	-1,91858	1,48119
CG (L)	-2,85	0,71	-4,01	0,004	-4,48384	-1,21190
CG (Q)	-2,07	0,74	-2,81	0,023	-3,77120	-0,37143
CP (L)	1,15	0,71	1,61	0,15	-0,49084	2,78110
CP (Q)	-2,04	0,74	-2,77	0,023	-3,74115	-0,34137
CO x CG	-1,46	0,93	-1,57	0,15	-3,59500	0,68000
CO x CP	-0,65	0,93	-0,70	0,5	-2,78500	1,49000
CG x CP	-0,48	0,93	-0,52	0,62	-2,61500	1,66000

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

Em negrito estão os valores estatisticamente significativos a 95%.

Tabela 13. ANOVA para a produção de lipases em FSm.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	303,08	p-1 (9)	33,68	4,9	3,18
Resíduo	54,99	n-p (9)	6,87		
Total	358,07	n-1 (17)			

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

Os gráficos de superfície de resposta estão representados na **Figura 21** e demonstram que a variação da concentração de óleo de canola foi positivamente significativa, uma vez que quanto maior é sua concentração uma maior atividade enzimática é obtida. Em contraste, a variação da concentração de D-glucose e de peptona foi negativamente significativa, visto que quanto menor a concentração desses dois compostos maior a atividade lipolítica.

Considerando todos os resultados, partindo da equação obtida como parâmetro principal e visando aumentar a produtividade, o novo meio de cultivo utilizado será chamado de Khanna modificado e composto por 3,5% de óleo de canola, 0,25% de D-glucose e 0,05% de peptona.

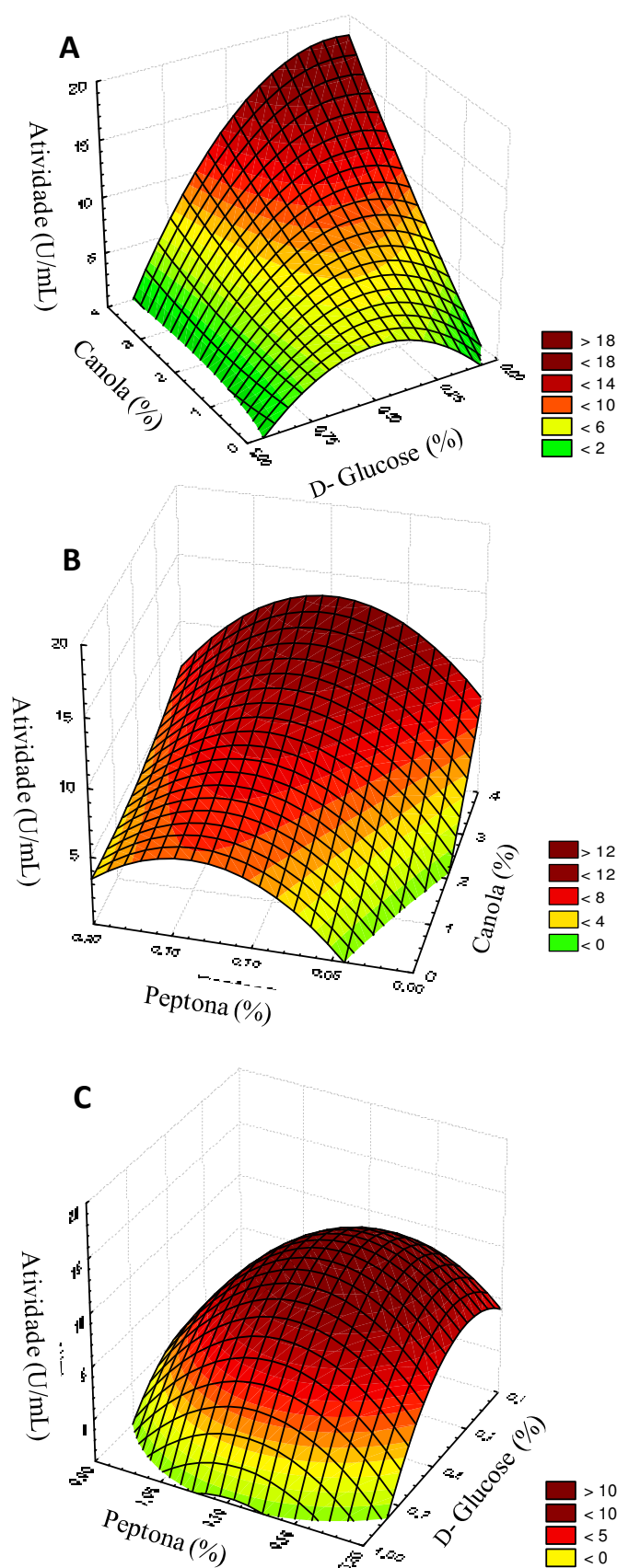


Figura 21. Superfície de resposta para o planejamento fatorial para FSm delineado para as variáveis óleo de canola, D-glucose e peptona. (A) Atividade (U/mL) x canola x D-glucose; (B) Atividade (U/mL) x canola x peptona; (C) Atividade (U/mL) x D-glucose x peptona.

4.6 Influência de fatores nutricionais na produção e secreção de lipases de *B. brongniartii* incubado em FES

A FES é um processo de fermentação que ocorre na ausência de água livre entre as partículas do substrato (Pandey; Soccol; Mitchell, 2000; Pandey, 2002; Rodriguez Couto; Sanromán, 2005; Hölker; Lenz, 2005). Esse tipo de fermentação é simples, de baixo custo, geralmente de alta produtividade, e requer menos espaço e energia (Mitchell *et al.*, 2000; Pandey; Soccol; Mitchell, 2000).

4.6.1 Variação do substrato para a produção de lipases em FES

Com o objetivo de estudar a FES para a produção de lipases pelo fungo *B. brongniartii* foram utilizados como substratos resíduos agroindustriais e substratos comerciais umedecidos com água deionizada. Os resíduos agroindustriais utilizados foram farelo de trigo (*Triticum* sp.), fibra de trigo, torta de pinhão manso (*Jatropha Curcas*), pinhão manso triturado, torta de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), farinha de centeio (*Secale cereale*), milho moído (*Zea* sp.), palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), farinha de mandioca (*Manihot esculenta*), soja moída (*Glycine max*) e amendoim moído (*Arachis hypogaea*). As culturas foram incubadas a 30° C, por 96 horas, com umidade relativa de 80%.

Os resultados (**Figura 22**) demonstram que o melhor substrato para a produção de lipases foi farelo de trigo, o que é evidenciado pelo valor de atividade (U/mL) (**Figura 22.A**) e de atividade por grama de substrato (**Figura 22.B**), que é 62% maior do que o segundo substrato com o qual se obteve maior atividade, a palha de milho.

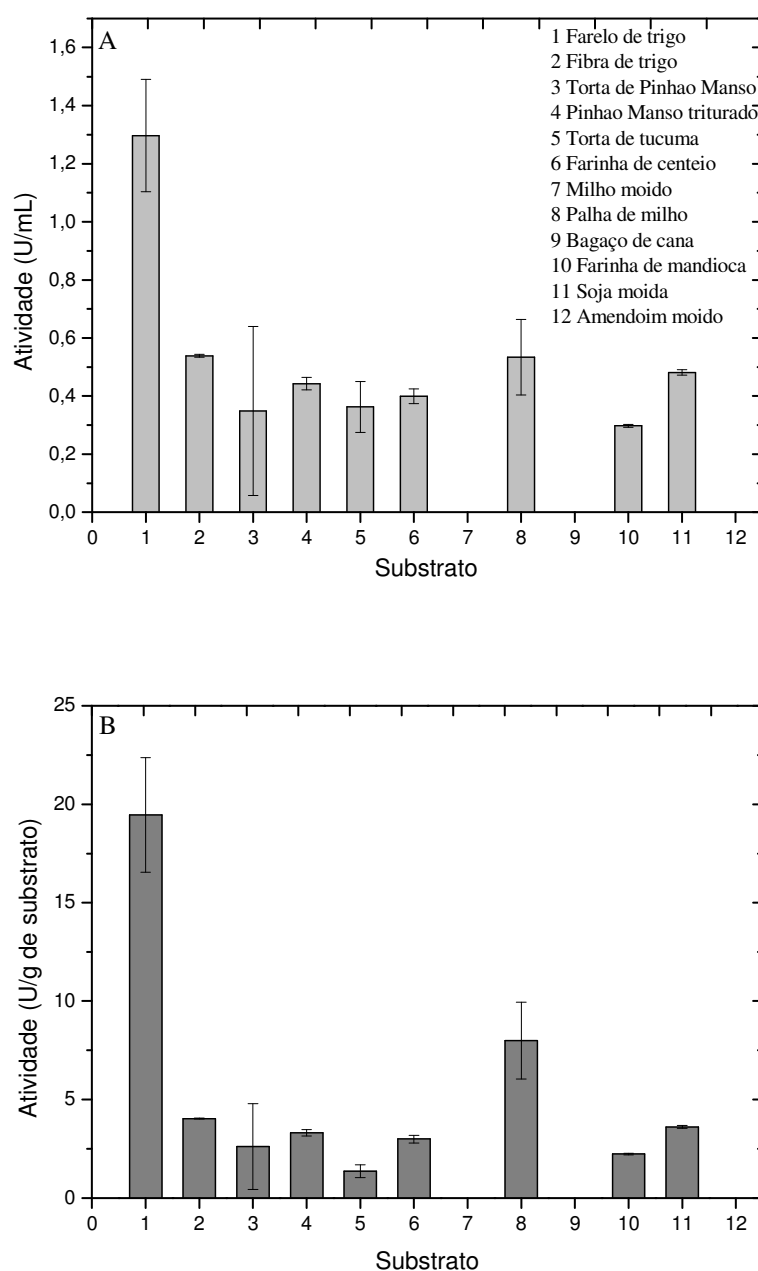


Figura 22. Efeito de diferentes substratos sobre a produção de lipases em FES pelo fungo *B. brongniartii*. (A) Atividade (U/mL) e (B) Atividade (U)/g de substrato. O fungo foi inoculado em diferentes substratos, na proporção 1:2 com água deionizada. 1 – Farelo de trigo; 2 – Fibra de trigo; 3 – Torta de pinhão manso; 4 – Pinhão manso triturado; 5 – Torta de tucumã; 6 – Farinha de centeio; 7 – Milho moído; 8 – Palha de milho; 9 – Bagaço de cana; 10 – Farinha de mandioca; 11 – Soja moída; 12 – Amendoim moído.

4.6.2 Produção de lipases em FES em função do tempo de cultivo

A FES tem grande potencial para a produção de enzimas e pode ter especial interesse para aqueles processos onde o extrato bruto pode ser usado (Pandey *et al.*, 1999). Com o objetivo de identificar o melhor tempo de cultivo em FES para a produção de lipases por *B. brongniartii*, o fungo foi inoculado em 2g de farelo de trigo umedecido com 4 mL de água deionizada e incubado a 30°C, com 80% de umidade. O meio foi previamente esterilizado em autoclave. As culturas foram retiradas a cada 24 horas, por 10 dias.

Os resultados (**Figura 23**) demonstram que a maior produção de lipases se deu após 168 horas de crescimento, sendo a atividade nesse tempo de 11U/mL, ou 165 U/g de substrato. O tempo de cultivo de 168 horas foi padronizado para os próximos experimentos.

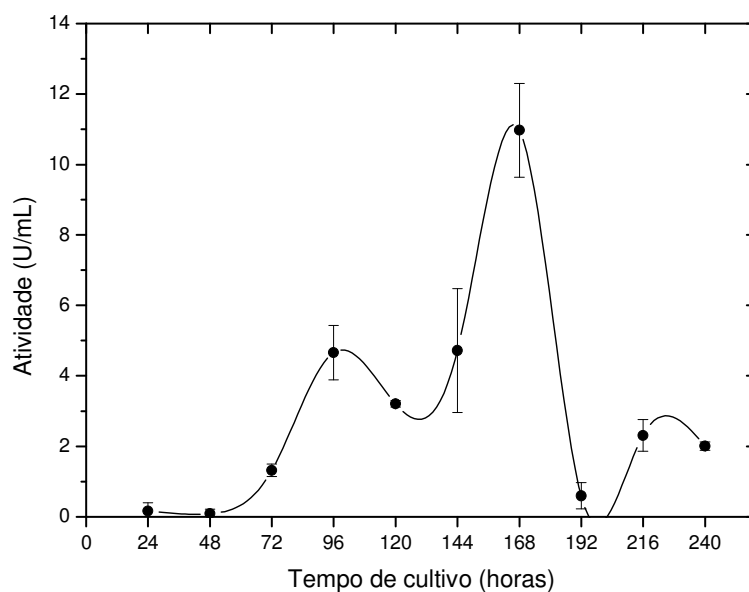


Figura 23. Efeito do tempo de cultivo na produção de lipases em FES pelo fungo *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em farelo de trigo e incubado por até 240 horas, a 30°C e 80% de umidade.

4.6.3 Efeito de diferentes soluções salinas na produção de lipases em FES

A adição de sais no meio de cultura utilizado para FES pode interferir tanto no crescimento do microrganismo quanto na produção de lipases. Com o objetivo de avaliar esse efeito, foram preparados meios de cultura com 2g de farelo de trigo e 4 mL de água deionizada, água de torneira, sais de Adams (item 3.5.1), solução de sais de Khanna (item 3.5.2.1) ou solução de sais SR (item 3.5.5.1). O fungo foi inoculado nos meios esterilizados e incubados a 30°C, 80% de umidade, por 168 horas.

Os resultados (**Figura 24**) demonstram que a atividade enzimática foi semelhante na maioria dos meios de cultura, com exceção do meio umedecido com solução de sais de Vogel. Com isso, foi mantida a água deionizada como meio para umedecer a FES para a produção de lipases de *B. brongniartii*.

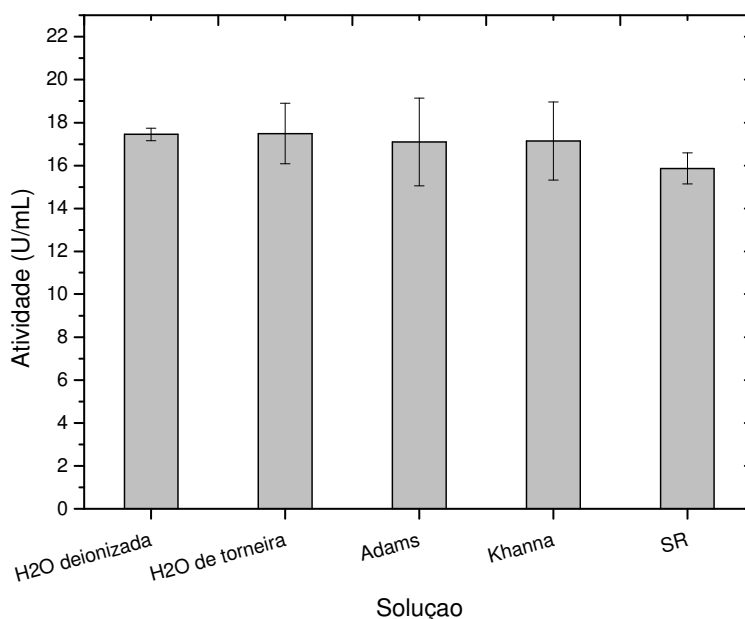


Figura 24. Efeito da solução utilizada para umedecer o meio para FES sobre a produção de lipases por *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em farelo de trigo umedecido com água deionizada, água de torneira, sais de Adams, solução de sais de Khanna, solução de sais SR ou solução de sais de Vogel, e incubado por 168 horas, a 30°C e 80% de umidade.

4.6.4 Efeito da adição de fontes extras de nitrogênio na produção enzimática em FES

A adição de fontes extras de nitrogênio em FES pode influenciar a produção enzimática do microrganismo. Com a finalidade de determinar essa influência foi testada

a suplementação do meio de cultivo em estado sólido com diferentes fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio.

Para a realização desse experimento o fungo foi inoculado em meios de cultura com 2g de farelo de trigo e 4 mL de água deionizada adicionada de 0,5% de uma das seguintes fontes de nitrogênio: extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio, acetato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio ou sulfato de amônio. O controle foi realizado com um meio sem a adição de fonte de nitrogênio. As culturas foram incubadas a 30° C, 80% de umidade, por 168 horas.

Os resultados obtidos (**Figura 25**) demonstram que para *B. brongniartii*, cultivado em farelo de trigo nas condições determinadas, a adição de fontes de nitrogênio não aumentou a produção de lipases, ao contrário, observa-se uma diminuição de cerca de 15% da produção dessa enzima quando adicionado extrato de levedura, peptona e nitrato de potássio; e uma inibição da produção de lipase e do crescimento do fungo (visualmente - dado não mostrado) quando adicionado acetato de amônio ao meio de cultivo. Dessa forma, não se adicionou fontes extras de nitrogênios ao meio de cultivo sólido nos experimentos posteriores.

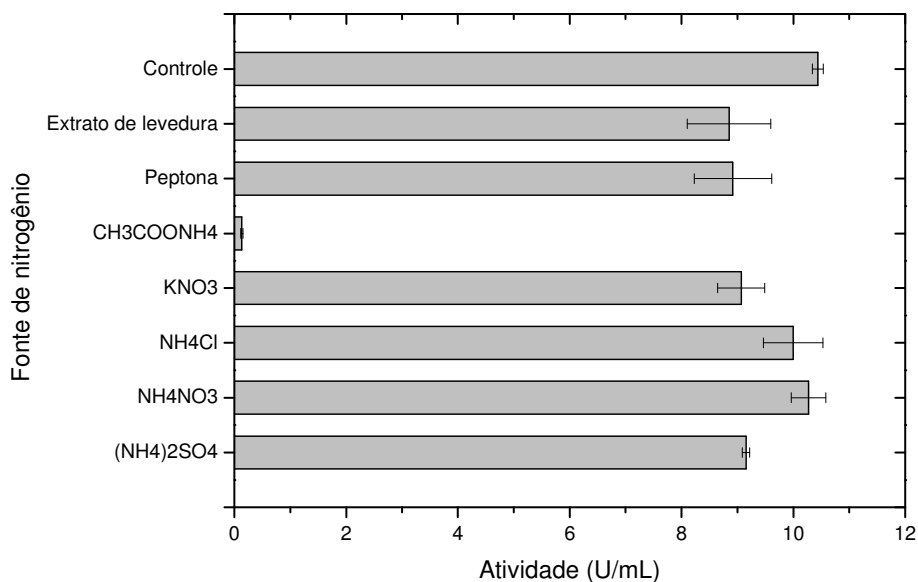


Figura 25. Efeito da adição de fontes de nitrogênio em FES sobre a produção de lipases por *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em farelo de trigo umedecido com água deionizada adicionada de 0,5% de extrato de levedura, peptona, nitrato de potássio, acetato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio ou sulfato de amônio, e incubado por 168 horas, a 30°C e 80% de umidade.

4.6.5 Efeito de fontes de carbono indutoras da produção de lipases produzidas por FES

A adição de óleo ao meio de cultivo pode induzir a produção de lipase em FES. Com o objetivo de testar o efeito de diferentes óleos na produção de lipases em FES, realizou-se um experimento utilizando doze óleos de origens diferentes nos meios de cultura.

Foram utilizados óleos de oliva, mamona, pequi, canola, nim, mineral, dendê, soja, macaúba, milho, girassol e gergelim. Os meios de cultura foram preparados com 2g de farelo de trigo e 4 mL de água deionizada e complementados com 10% (v/m) de cada um dos doze tipos de óleos. As culturas foram incubadas a 30°C, 80% de umidade, por 168 horas.

Comparando com os resultados obtidos ao meio incubado sem a adição de óleo (controle) (**Figura 26**) observa-se que o fungo *B. brongniartii* teve cerca de 10% de aumento na produção de lipases quando o meio foi suplementado com óleo de gergelim e cerca de 70% de aumento quando suplementado com óleo nim. O óleo de nim foi então padronizado como indutor para a produção de lipases por FES.

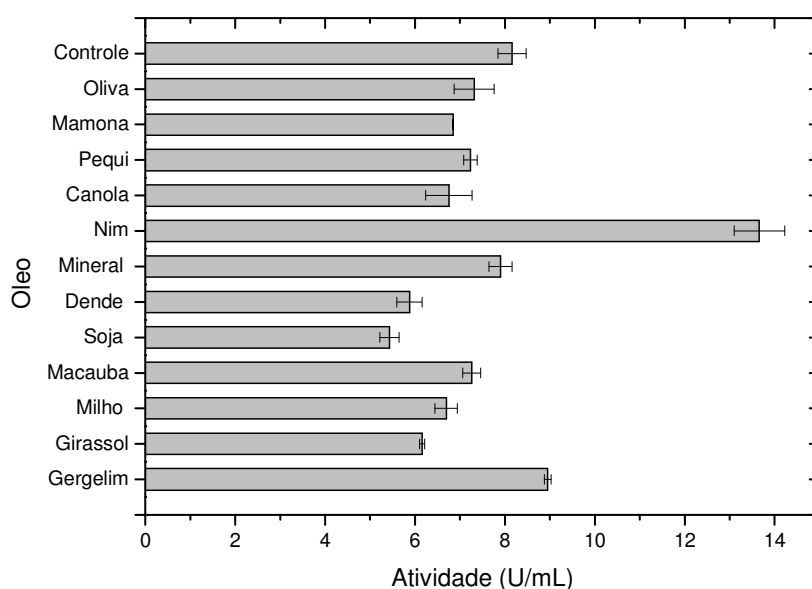


Figura 26. Efeito da adição de óleos em FES sobre a produção de lipases por *B. brongniartii*. O fungo foi inoculado em meio contendo 2g de farelo de trigo umedecido com 4 mL de água deionizada, suplementado com 5% (v/v) de óleo de diferentes origens. As culturas foram incubadas por 168 horas, a 30°C e 80% de umidade.

4.6.6 Avaliação do efeito da proporção de farelo de trigo, água e óleo de nim sobre a produção de lipases em FES através de planejamento fatorial

Foi realizada uma análise de regressão para testar a influência das variáveis farelo de trigo (FT), água (A) e óleo nim (ON) na síntese de lipases pelo fungo *Beauveria brongniartii*, em fermentação estado sólido. Para tanto, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 18 experimentos.

O fungo foi inoculado nos variados meios de cultivo e incubados a 30°C, 80% de umidade, por 168 horas. Os meios foram filtrados e o extrato bruto foi usado para dosagem enzimática.

Os resultados experimentais foram avaliados através de uma análise de regressão em decorrências de uma equação (**Equação 2**) de produção de lipase (U/mL) em função da quantidade de farelo de trigo em gramas (FT) e de água em mililitro (A).

$$\text{Lipase (U/mL)} = 12,66 - 4,47.(FT)^2 + 4,52.A$$

Equação 2

O valor de R e R² para a equação é de 0,903 e 0,815, respectivamente. Na análise de variância, ANOVA, o teste F mostrou uma boa performance, com significância de $p < 0,05$, o que indica que o modelo utilizado reflete em uma relação entre os componentes do meio de cultivo na produção de lipase.

O resultado da produção de lipase está representado na (**Tabela 14**) indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em duplicata. Verifica-se que a maior produção de lipase é destacada no experimento 12, em torno de 26 U/mL.

O valor de p de cada parâmetro está indicado na **Tabela 15**. Os valores encontrados nessa tabela sugerem que efeito quadrático do farelo de trigo é negativo, com significância de 0,007, e que o efeito linear da água é positivo, com significância de 0,005. Esse resultado sugere a importância da umidificação do meio para o desenvolvimento do fungo e a produção de lipase. O resultado da ANOVA, assim como o teste $F_{\text{calculado}}$ e o valor de F_{tabelado} estão apresentados na **Tabela 16**, e demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente válido, pois $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} .

Tabela 14. Atividade lipolítica total produzida pelos extratos brutos de *B. brongniartii* através de planejamento fatorial para produção em FES

Experimento	FT (g)	A (mL)	ON (mL)	Atividade (U/mL)
1	-1 (2)	-1 (4)	-1 (0,2)	8,16 $\pm$ 0,22
2	-1 (2)	-1 (4)	+1 (0,6)	2,98 $\pm$ 0,17
3	-1 (2)	+1 (8)	-1 (0,2)	13,34 $\pm$ 0,32
4	-1 (2)	+1 (8)	+1 (0,6)	5,60 $\pm$ 0,07
5	+1 (6)	-1 (4)	-1 (0,2)	0,07 $\pm$ 0,00
6	+1 (6)	-1 (4)	+1 (0,6)	0,14 $\pm$ 0,01
7	+1 (6)	+1 (8)	-1 (0,2)	7,46 $\pm$ 0,03
8	+1 (6)	+1 (8)	+1 (0,6)	1,66 $\pm$ 0,06
9	-1,68 (0,64)	0 (6)	0 (0,4)	3,13 $\pm$ 0,06
10	+1,68 (7,36)	0 (6)	0 (0,4)	0,45 $\pm$ 0,02
11	0 (4)	-1,68 (2,64)	0 (0,4)	0,25 $\pm$ 0,01
12	0 (4)	+1,68 (9,36)	0 (0,4)	26,99 $\pm$ 0,08
13	0 (4)	0 (6)	-1,68 (0,064)	13,49 $\pm$ 0,59
14	0 (4)	0 (6)	+1,68 (0,736)	5,23 $\pm$ 0,46
15	0 (4)	0 (6)	0 (0,4)	12,68 $\pm$ 0,08
16	0 (4)	0 (6)	0 (0,4)	12,40 $\pm$ 0,36
17	0 (4)	0 (6)	0 (0,4)	12,11 $\pm$ 0,22
18	0 (4)	0 (6)	0 (0,4)	12,86 $\pm$ 0,27

Os símbolos FT, A e ON representam, respectivamente, as variáveis farelo de trigo, água e óleo nim.

Tabela 15. Coeficientes de regressão para a produção de lipase em FES.

	Coeficiente	Erro Padrão	t	p	Limite de confiança - 95%	Limite de confiança +95%
Intercepto	12,66	2,21	5,74	0,00	7,5742	17,7539
FT (L)	-1,85	1,20	-1,55	0,16	-4,6109	0,9095
FT (Q)	-4,47	1,25	-3,59	0,007	-7,3363	-1,5943
A (L)	4,52	1,20	3,77	0,005	1,7563	7,2767
A (Q)	-0,27	1,25	-0,22	0,83	-3,1437	2,5983
ON (L)	-2,38	1,20	-1,99	0,08	-5,1447	0,3756
ON (Q)	-1,78	1,25	-1,43	0,19	-4,6535	1,0885
FT x A	0,14	1,56	0,09	0,93	-3,4670	3,7425
FT x ON	0,90	1,56	0,58	0,58	-2,7058	4,5037
A x ON	-1,05	1,56	-0,67	0,52	-4,6579	2,5517

Tabela obtida através do software Statistica 8.0

Em negrito estão os valores estatisticamente significativos a 95%

Tabela 16. ANOVA para a produção de lipases por FES.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	687,98	p-1 (9)	76,44	3,9	3,18
Resíduo	156,39	n-p (9)	19,55		
Total	844,38	n-1 (17)			

Tabela obtida através do software Statistica 8.0

Os gráficos de superfície de resposta estão representados na **Figura 27** e demonstram que a variação da concentração de água foi positivamente significativa, uma vez que quanto maior é sua quantidade maior a atividade enzimática obtida. É possível verificar também, que a maior produção enzimática se dá com quantidades intermediárias de farelo de trigo e com quantidades de intermediárias a pequenas de óleo nim.

Considerando todos os resultados, partindo da equação obtida como parâmetro principal e visando aumentar a produtividade, o novo meio de cultivo utilizado será composto por 4g de farelo de trigo, 9 mL de água deionizada e 0,4 mL de óleo nim.

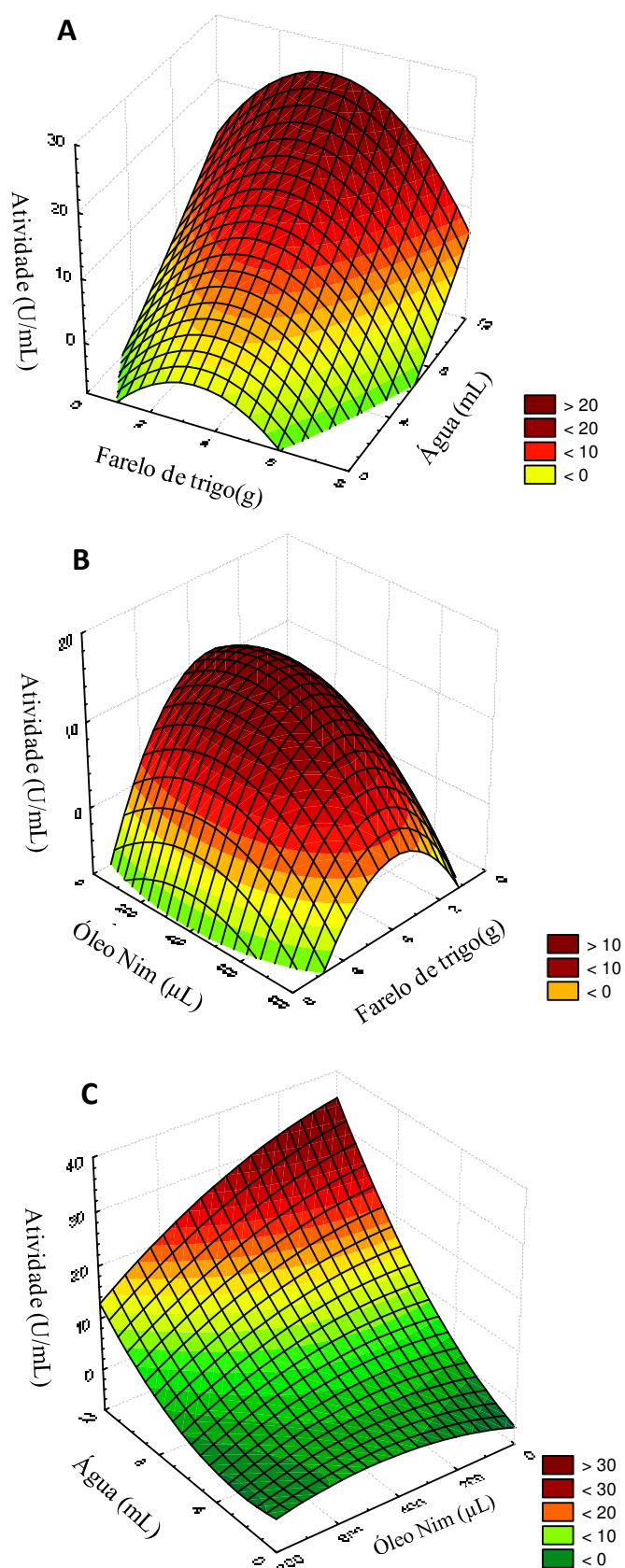


Figura 27. Superfície de resposta para o planejamento fatorial para FES delineado para as variáveis farelo de trigo, água e óleo nim. (A) Atividade (U) x farelo de trigo x água; (B) Atividade (U) x óleo nim x farelo de trigo; (C) Atividade (U) x água x óleo nim.

4.7 Comparação entre as produções padronizadas dos meios de fermentação FSm e FES

Com a finalidade de selecionar um extrato bruto para estudos de purificação foi realizado um experimento no qual o fungo *B. brongniartii* foi inoculado em cultura de FSm e de FES nas condições otimizadas. Os resultados das produções enzimáticas estão indicados na **Tabela 17**.

Observa-se que a produção total de lipase é maior quando o fungo foi cultivado em FES, contudo, a quantidade de proteínas presentes nesse extrato é dez vezes maior daquele presente no extrato bruto extracelular produzido por FSm. Essa grande quantidade de proteínas se deve principalmente à presença de proteínas solúveis do substrato de crescimento (farelo de trigo), entretanto, como está presente no extrato enzimático, tem que ser levada em consideração quando da escolha de um extrato para a purificação. O extrato extracelular produzido por FSm apresenta uma atividade específica cerca de 9 vezes maior que aquela produzida por FES, por conseguinte, optou-se por estudar a purificação do extrato bruto extracelular produzido por FSm pelo fungo *B. brongniartii*.

Tabela 17. Comparação entre os dois tipos de fermentações otimizadas para a produção de lipases

Fermentação	Condições	Atividade (U/mL)	Proteínas (mg/mL)	Atividade específica (U/mg de proteínas)
FSm	Meio Khanna, OC 3,5%, G 0,25%, P 0,05%, 30°C, 100 rpm, 72 horas.	17,8 ± 0,22	0,65 ± 0,02	27,37
FES	FT 4g, A 9 mL, ON 0,4 mL, 30°C, 80% umidade, 168 horas.	25,65 ± 0,26	6,606 ± 0,3	3,88

OC: óleo de canola; G: D-glucose; P: peptona; FT: farelo de trigo; A: água e ON: óleo nim.

4.8 Caracterização bioquímica dos extratos brutos de *Beauveria brongniartii* produzidos por FSm e por FES

A caracterização enzimática também se mostra de extrema importância, pois através desta têm-se as melhores condições de atividade da enzima estudada.

4.8.1 Influência da temperatura na atividade das lipases produzidas por FSm e FES

Com o objetivo de estudar o efeito da temperatura de reação para a atividade lipolítica, os extratos brutos produzidos por FSm e FES foram submetidos a ensaios enzimáticos a temperaturas variadas – de 30 a 80°C.

Os três extratos foram ativos em todas as temperaturas testadas. Os resultados (**Figura 28**) demonstram que a maior atividade obtida para as lipases intracelulares produzidas por FSm e as lipases produzidas por FES foi a 60°C, enquanto que para as lipases extracelulares produzidas por FSm foi a 70°C, com diferença em relação a temperatura de 60°C sem significância estatística. Foram observados mais de um pico de atividade para os três extratos enzimáticos, o que sugere a presença de mais de uma forma da enzima nos extratos. Como padrão para os próximos experimentos adotou-se 60°C como temperatura de ensaio enzimático.

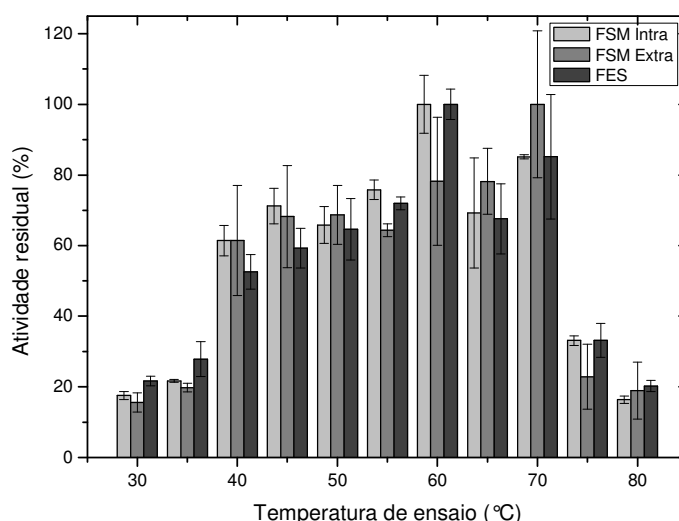


Figura 28. Temperatura ótima de ensaio para as lipases intra (cinza claro) e extracelulares (cinza médio) produzidas por FSm e para as lipases produzidas em FES (cinza escuro). O maior valor de atividade para cada extrato enzimático foi considerado como 100% de atividade

4.8.2 Termoestabilidade das lipases de *B. brongniartii* produzidas por FSm e FES

Condições extremas de temperatura e pH tendem a mudar a conformação das enzimas, inativando-as (Jaenicke, 1991), quando isso acontece diz-se que essas enzimas são instáveis nessas condições, não sendo adequadas para processos que requerem temperaturas e pH que as inativam.

Neste experimento os extratos brutos intracelular e extracelular produzidos em FSm e o extrato bruto produzido em FES foram incubados por 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 minutos em temperaturas constantes de 40°C, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C, e dosadas como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero) e representados graficamente (**Figura 29**).

As lipases intracelulares e extracelulares produzidas por FSm do fungo *B. brongniartii* (**Figura 29.A e B**) apresentaram-se estáveis durante o tempo de incubação testado nas temperaturas de 40°, 50°, 60° e 70°C, e alcançaram a T_{50} após 180 e 35 minutos de incubação a 80°C, respectivamente. As lipases produzidas por FES (**Figura 29.C**) alcançou a T_{50} após 90 minutos de incubação a 70°C e 7 minutos a 80°C. A diferença na termoestabilidade das enzimas pode sugerir a presença de enzimas diferentes nos três extratos ou ainda a presença de substâncias que atuam sobre essas enzimas de forma a lhe conferir maior ou menor estabilidade.

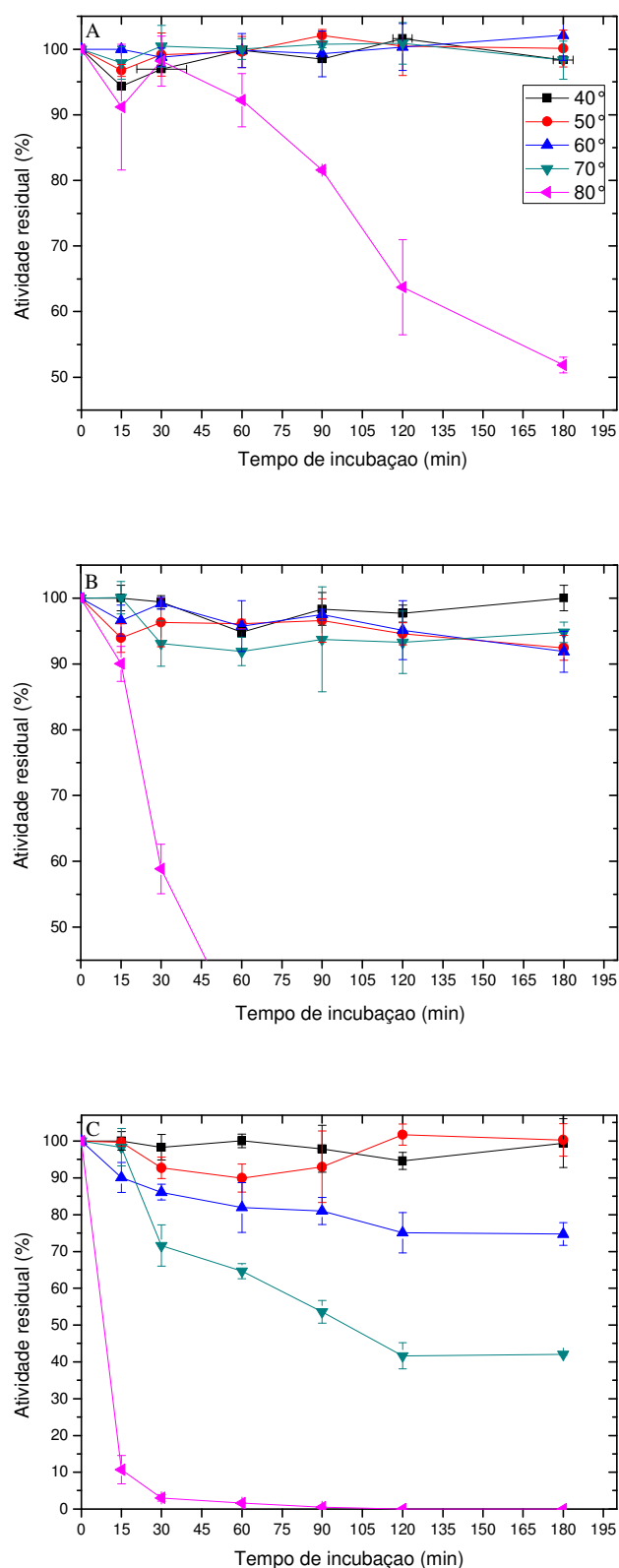


Figura 29. Termoestabilidade das lipases intra (A) e extracelulares (B) produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES (C) em função do tempo de incubação. Os extratos brutos foram incubados em temperaturas de 40°, 50°, 60°, 70° e 80°C por tempos variando de 0 a 180 minutos e depois submetidos a ensaio enzimático nas condições ótimas de atividade.

4.8.3 Influência do pH na atividade das lipases produzidas por FSm e FES

As enzimas possuem um pH, ou intervalo de pH, no qual a sua atividade é máxima (Nelson; Cox, 2006), por isso é importante investigar o melhor pH de reação enzimática. Nesse estudo foi testada a atividade enzimática em 14 pHs diferentes, na faixa de 2,5 a 9,0. As enzimas intra e extracelular produzidas em FSm e as enzimas produzidas por FES, foram submetidas a ensaios enzimáticos que foram incubados em diferentes pHs, para tanto se utilizou tampão citrato-fosfato (McIlvaine), tampão citrato de sódio e tampão Tris-HCl, 100mM, nas faixas de pH de 2,5-8,0, 2,5-7,0 e 7,5-9,0, respectivamente. Os três extratos brutos produzidos por *B. brongniartii* apresentaram maior atividade quando tamponadas em pHs ácidos, no intervalo de pH de 4,5-6,0 (**Figura 30**). A partir disso optou-se por continuar utilizando como tampão de reação o citrato-fosfato (McIlvaine) pH 5,5, que abrange a faixa de pH ótimo de todos os extratos enzimáticos e já vinha sendo utilizados nos procedimentos anteriores.

4.8.4 Estabilidade ao pH das lipases produzidas por *B. brongniartii* em FSm e FES

Dando continuidade aos testes de estabilidade das lipases do fungo em estudo realizou-se um experimento no qual os três extratos brutos foram incubados por 2 horas em diferentes pHs, a temperatura ambiente.

As enzimas brutas foram incubadas em tampão citrato-fosfato 100mM nos pHs 3,0 a 8,0, variando de 0,5 em 0,5, na proporção de 1:1. Após duas horas as amostras foram submetidas a ensaios enzimáticos. Nestes ensaios foi utilizado tampão acetato de sódio 200mM, pH 5,5. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem e foi considerada 100% a condição em que houve maior atividade lipolítica para cada extrato bruto.

As lipases intracelulares produzidas por FSm e as lipases produzidas por FES de *B. brongniartii* (**Figura 31.A e C**) mostraram-se estáveis nos diferentes pHs testados, sendo que a primeira atingiu a T_{50} apenas em pH 8,0. Quanto as lipases extracelulares (**Figura 31.B**), esta apresentou maior atividade depois de ser incubada em pH 5,5-7,5, mas não alcançou a T_{50} em nenhum dos outros pHs testados.

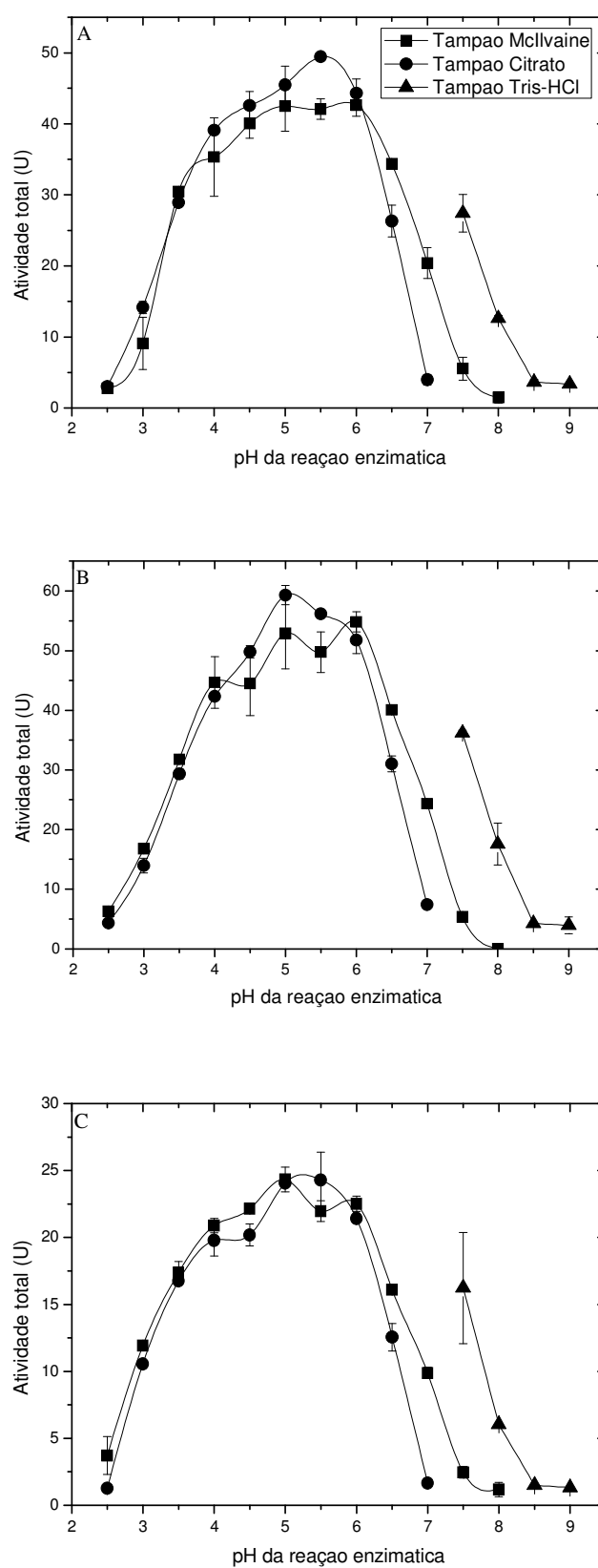


Figura 30. pH ótimo de ensaio para as lipases intra (A) e extracelulares (B) produzidas por FSm e para as lipases produzidas em FES (C). Foram utilizados nos ensaios enzimáticos os tampões McIlvaine, Citrato e Tris-HCl.

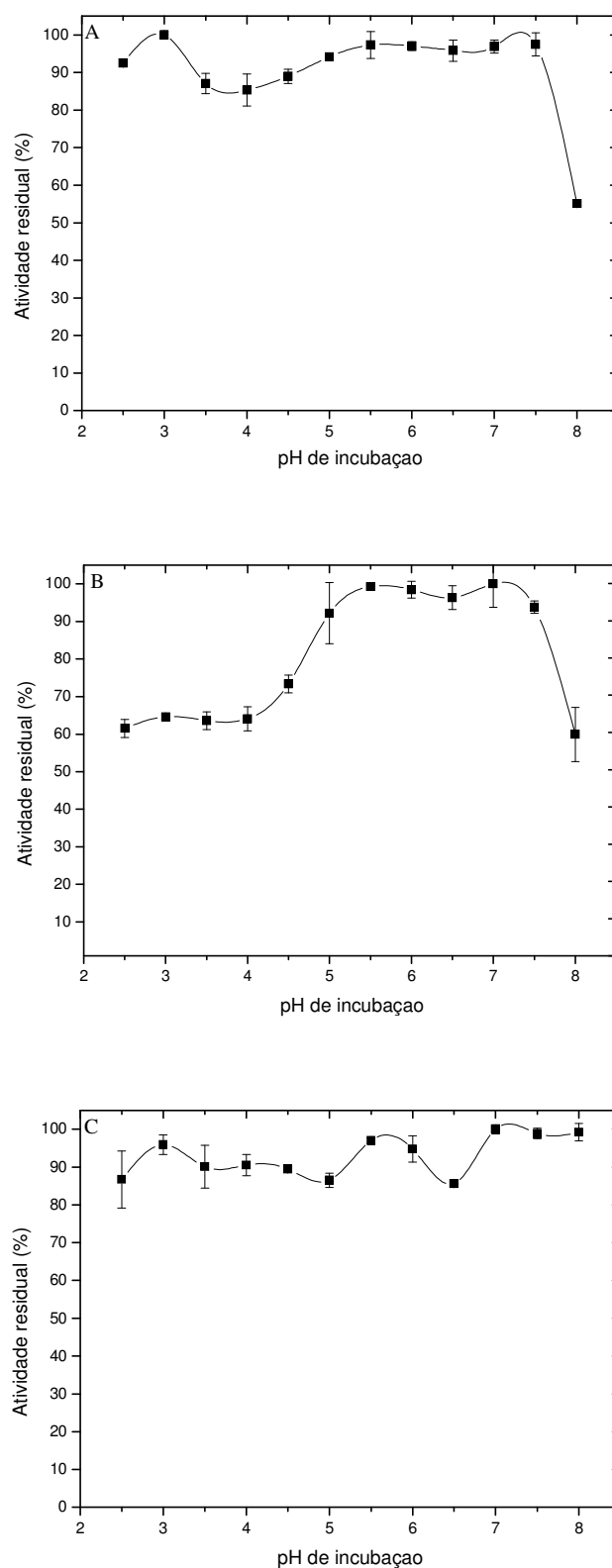


Figura 31. Estabilidade ao pH das lipases intra (A) e extracelulares (B) produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES (C). Os extratos brutos foram incubados por 2 horas em tampão citrato-fosfato 100mM nos pHs de 2,5 a 8,0, e depois submetidos a ensaios enzimáticos nas condições ótimas de atividade.

4.8.5 Estabilidade a solventes orgânicos das lipases produzidas por *B. brongniartii* em FSm e FES

Com a finalidade de testar a estabilidade das lipases do fungo em estudo o extrato bruto intracelular e o filtrado produzidos por FSm e as lipases produzidas por FES foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas em Dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, acetonitrila, etanol, acetona, isopropanol ou butanol, na proporção 1:1. Solventes com polaridade mais baixa não foram testados, pois, assim como ocorreu com o butanol, há a formação de duas fases imiscíveis que requerem agitação constante para homogeneização do sistema.

As lipases intra e extracelulares produzidas em FSm de *B. brongniartii* (**Figura 32**) foram estáveis em praticamente todos os solventes orgânicos. Ambas tiveram menor atividade residual quando incubadas nos solventes acetonitrila e isopropanol. As lipases intracelulares apresentaram 70% e 53% de atividade residual e as lipases extracelulares apresentaram 80% e 65% de atividade residual depois de incubadas nesses dois solventes, respectivamente. Houve aumento da atividade lipolítica desses dois extratos quando incubadas em metanol (112 e 110% de atividade residual, respectivamente), e das enzimas extracelulares quando incubada em etanol (107% de atividade residual).

No caso das lipases produzidas por FES (**Figura 32**) praticamente todos os solventes inativaram a enzima, havendo atividade residual apenas quando incubada em DMSO, acetona e metanol, com atividade residual de 74%, 26% e 13%, respectivamente.

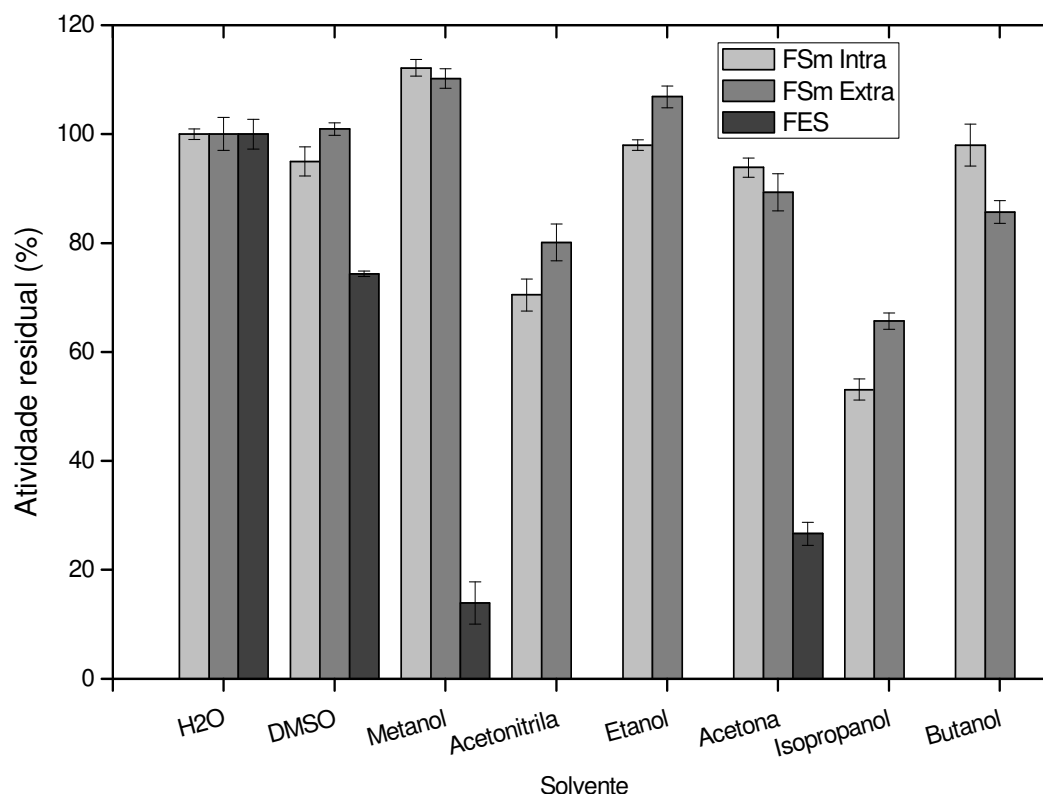


Figura 32. Estabilidade a solventes orgânicos das lipases intra (cinza claro) e extracelulares (cinza médio) produzidas por FSm e das lipases produzidas em FES (cinza escuro). Os extratos brutos foram incubados por 24 horas nos solventes orgânicos Dimetilsulfóxido (DMSO), Metanol, Acetonitrila, Etanol, Acetona, Isopropanol e Butanol e em água deionizada (controle), na proporção 1:1 (solvente:extrato bruto). Decorrido o tempo de incubação as amostras foram submetidas a ensaios enzimáticos nas condições ótimas de atividade.

4.8.6 Avaliação da atividade lipolítica do extrato extracelular produzido por FSm e do extrato produzido por FES sobre substratos naturais

Lipases são enzimas que hidrolisam triacilgliceróis a mono e diacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol. Sua ação pode ser medida por métodos colorimétricos, como o utilizado no presente trabalho, com o substrato sintético *p*-nitrofenilpalmitato. Entretanto, a atividade lipolítica pode ser determinada utilizando-se os substratos naturais dessa enzima, através do método titulométrico, em que a unidade de atividade (U) se dá em μmols de ácido graxo liberado/min.

Com o objetivo de avaliar a atividade lipolítica do extrato extracelular produzido por FSm e do extrato produzido por FES sobre substratos naturais de origens diferentes, as enzimas brutas foram submetidas a ensaios enzimáticos que consistiram em 4 mL de óleo vegetal, 2,4 mL de tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,5, 0,8 mL de Triton X-100 e

0,8 mL de extrato enzimático. A reação foi incubada em shaker que se movimenta por excursão, a 48°C, 140epm, por 120 minutos.

Foram utilizados como substrato trioleína, óleo de oliva, óleo de milho, óleo de mamona, óleo de castanha de macaúba, óleo de gergelim, óleo de soja, óleo nim, óleo de canola, óleo de pequi, óleo de girassol e óleo de dendê.

Concordando com o observado para o substrato sintético (**Tabela 17**), o extrato enzimático produzido por FES possui maior atividade lipolítica que o produzido por FSm (**Figura 33**). Observa-se que a maior atividade do extrato produzido por FSm se deu sobre trioleína, seguida por óleo de soja, milho e girassol. E para o extrato bruto produzido por FES, a maior atividade lipolítica se deu sobre óleo de oliva, seguido de óleo de girassol, milho, gergelim e soja.

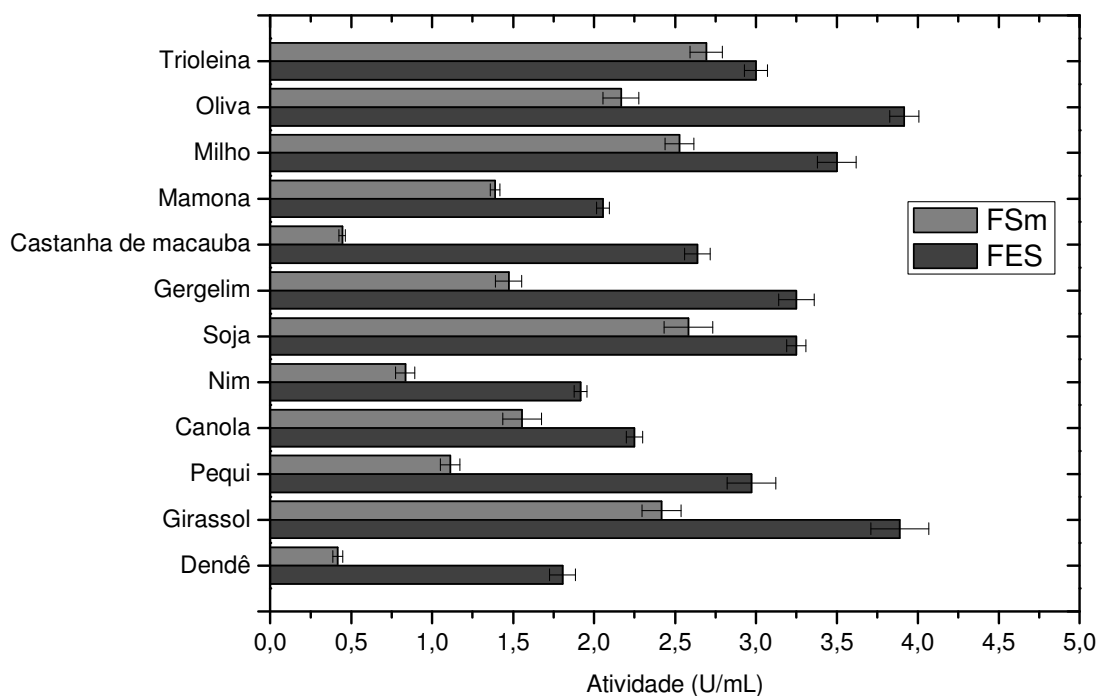


Figura 33. Atividade enzimática do extrato bruto extracelular produzido por FSm (barras cinza claro) e do extrato bruto produzido por FES (barras cinza escuro) sobre diferentes óleos vegetais. A reação foi realizada utilizando 50% de óleo vegetal, 30% de tampão, 10% de Triton X-100 e 10% de extrato enzimático. A reação foi incubada a 48°C, por 120 minutos a 140 epm (excursão por minuto).

4.9 Estudos de purificação parcial do extrato bruto extracelular produzido por FSm pelo fungo *B. brongniartii*

Conforme descrito anteriormente, para estudos de purificação das lipases de *B. brongniartii*, optou-se pelo extrato bruto extracelular produzido por FSm, visto que possui maior atividade específica que o extrato bruto produzido por FES, e é de mais fácil obtenção que o extrato intracelular produzido por FSm.

O procedimento de purificação parcial foi repetido três vezes e o que está aqui demonstrado é um experimento representativo desse procedimento. Um volume de 315 mL de extrato bruto extracelular, ajustado com Tris-HCl concentração final 50mM, pH 7,5, foi aplicado em uma coluna de troca aniônica DEAE-Celulose equilibrada em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5 (**Figura 34. A**). Foi detectado um pico de atividade, que foi eluído com um gradiente linear de NaCl (0-1,5M). As frações referentes ao pico de atividade foram reunidas em um *pool* para a determinação da atividade e em seguida aplicado em coluna de interação hidrofóbica, Octyl-Sepharose. Esse *pool* de atividade correspondeu a 20% das lipases totais aplicadas na resina (**Tabela 18**). A fração de lipases (cerca de 80%) que ficou retida na resina foi considerada imobilizada e posteriormente estudada.

Após ser aplicada em Octyl-Sepharose, a atividade lipolítica foi eluída em um gradiente linear de Triton X-100 (0-0,5%) (**Figura 34. B**). As frações contendo o pico de atividade enzimática foram reunidas em um *pool*, concentradas em filtros de 10 kDa para aplicação em géis de SDS-PAGE e PAGE, para análise da pureza e caracterização bioquímica.

Após os procedimentos de purificação parcial, foi recuperado um volume de 30 mL, com atividade específica de 123,74 U/mg de proteínas e fator de purificação de 5,12. A recuperação foi de 15,67%.

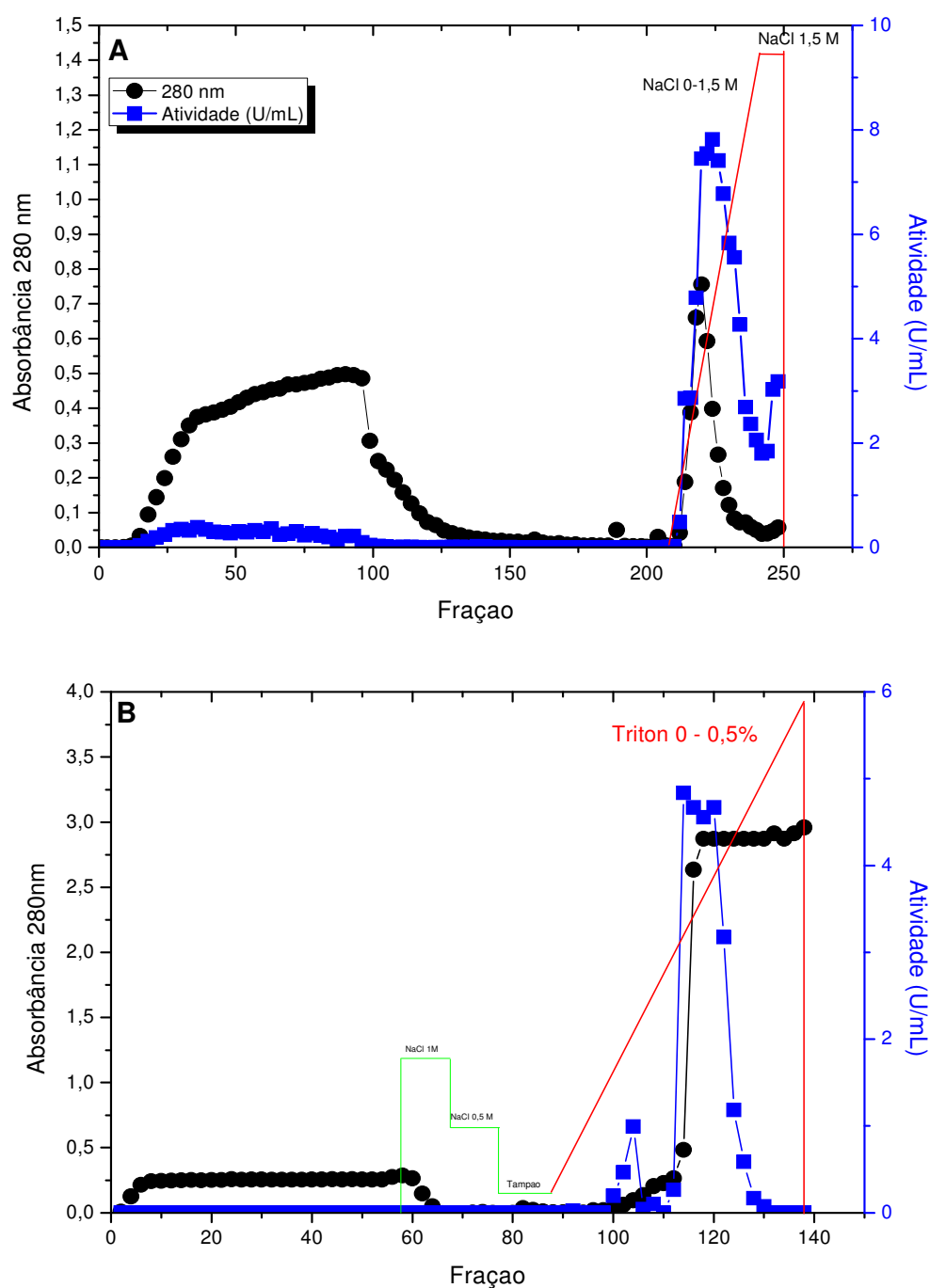


Figura 34. Distribuição de proteínas (●) e atividade lipolítica (■) do extrato enzimático extracelular produzido por FSm após eluição em cromatografia de troca aniônica DEAE-Celulose (A) e de interação hidrofóbica Octyl-Sepharose (B). (—) gradiente contínuo de NaCl (0-1,5M) em (A) e gradiente contínuo de Triton X-100 (0-0,5%) em (B). (—) gradiente reverso descontínuo de NaCl (1,0-0M).

Tabela 18. Purificação de uma fração de lipases extracelulares produzidas por FSm

	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Fator de purificação (vezes)
Extrato bruto	315	3643,08	150,65	24,18	100	1
DEAE-Celulose	112	754,51	34,09	22,13	20,71	0,92
Octyl-Sepharose	30	571,01	4,61	123,86	15,67	5,12

4.9.1 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), não desnaturante (PAGE) e atividade em gel de agarose 1%

Após os procedimentos cromatográficos, foram feitas eletroforeses em condições denaturantes e não denaturantes, a fim de avaliar o grau de pureza da enzima e também estimar sua massa molecular (**Figura 35**). Em SDS- PAGE observa-se a presença de duas bandas de proteínas obtidas após a eluição em Octyl-Sepharose (**Figura 35.A**), uma com aproximadamente 46,85 kDa e outra com cerca de 41,84 kDa (**Figura 35.C**). Essa mesma amostra foi aplicada em eletroforese em condições não denaturantes (PAGE), observando-se novamente duas bandas de proteínas (**Figura 35.B**). Esse gel foi colocado em contato com um gel de agarose 1% (m/v), fundida em tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,0, contendo óleo de oliva 5% (v/v), Victória Blue 0,01% (m/v) e Triton X-100 1,5% (v/v) e incubados a 60°C *overnight*. Após o tempo de incubação foi possível detectar, por mudança na coloração do gel na posição onde houve reação enzimática, que a banda protéica superior no PAGE é a que possui atividade lipolítica (**Figura 35.B**). Então, utilizando uma duplicata do PAGE, essa banda foi recortada, eluída em tampão de corrida SDS-PAGE e aplicada em gel de SDS-PAGE para determinar qual das duas bandas protéicas seria a lipase. De acordo com esse procedimento a lipase nessa amostra parcialmente purificada é a proteína com 46,85 kDa (**Figura 35.A**) e a outra proteína foi considerada contaminante.

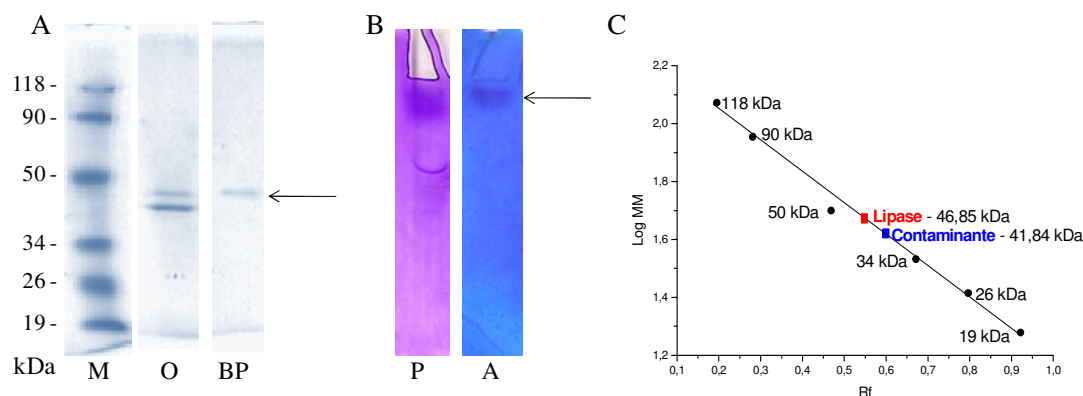


Figura 35. Eletroforese e representação logarítmica da massa molecular da lipase parcialmente purificada de *Beauveria brongniartii*. (A) SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilhante Blue*; (B) PAGE 7% corado com *Coomassie Brilhante Blue*, com duas bandas visíveis e gel de atividade em agarose, mostrando que apenas uma das bandas do PAGE tem atividade lipolítica; (C) determinação da massa molecular em SDS-PAGE. M- Marcador de massa molecular; O- Amostra do pico enzimático eluído da Octyl-Sepharose; BP- Amostra gerada a partir da banda do gel de eletroforese PAGE com atividade lipolítica; P- PAGE; A- gel de atividade; (←) lipase.

4.9.2 Otimização das condições de reação da lipase parcialmente purificada através de delineamento fatorial

Foi realizada uma análise de regressão para testar a influência das variáveis temperatura (T) e pH na atividade da lipase parcialmente purificada pelos procedimentos cromatográficos descritos anteriormente. Para tanto, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 12 experimentos, conforme descrito em material e métodos.

Os resultados experimentais foram avaliados através de uma análise de regressão em decorrência de uma equação (**Equação 3**) de atividade lipolítica (U/mL) em função da temperatura (T) e pH.

$$\text{Lipase (U/mL)} = 19,33 - 1,60.T - 7,66.(T)^2 - 9,02.(pH)^2$$

Equação 3

O valor de R e R^2 para a equação é de 0,99 e 0,98 respectivamente. O teste F mostrou uma significância de $p < 0,05$, o que indica que o modelo utilizado reflete em uma relação entre a temperatura e pH de reação da lipase.

O resultado da atividade lipolítica está representado na **Tabela 19** indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em duplicata. Verifica-se que a maior atividade lipolítica se dá nos pontos centrais, sendo maior no experimento de número 12, com 19,57 U/mL.

Os valores de p , que avaliam a significância e contribuição de cada parâmetro do modelo equacional estatístico, assim como os coeficientes de regressão dos parâmetros estão indicados na **Tabela 20**, e indicam significância do termo linear da temperatura e dos termos quadráticos da temperatura e do pH. O resultado da ANOVA, assim como o teste $F_{\text{calculado}}$ e o valor de F_{tabelado} estão apresentados na **Tabela 21**, e demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente válido, pois $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi altamente significativo e maior que F_{tabelado} .

Tabela 19. Atividade lipolítica em U/mL da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH através do DCCR.

Experimento	T (°C)	pH (pH)	Atividade (U/mL)
1	-1 (30)	-1 (3,0)	4,39 $\pm$ 0,03
2	-1 (30)	+1 (8,0)	7,91 $\pm$ 0,06
3	+1 (70)	+1 (8,0)	1,36 $\pm$ 0,02
4	+1 (70)	-1 (3,0)	0,24 $\pm$ 0,01
5	-1,414 (21,7)	0 (5,5)	3,93 $\pm$ 0,05
6	+1,414 (78,3)	0 (5,5)	2,42 $\pm$ 0,06
7	0 (50)	-1,414 (1,96)	0,27 $\pm$ 0,01
8	0 (50)	+1,414 (9,04)	0,65 $\pm$ 0,03
9	0 (50)	0 (5,5)	19,12 $\pm$ 0,09
10	0 (50)	0 (5,5)	19,24 $\pm$ 0,14
11	0 (50)	0 (5,5)	19,41 $\pm$ 0,12
12	0 (50)	0 (5,5)	19,57 $\pm$ 0,13

O símbolo T representa a variável temperatura de reação.

Tabela 20. Coeficientes de regressão para a atividade da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH.

	Coeficiente	Erro Padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Intercepto	19,33	0,84	23,02	0,00	17,278	21,388
T (L)	-1,60	0,59	-2,70	0,04	-3,057	-0,151
T (Q)	-7,66	0,66	-11,55	0,00	-9,289	-6,040
pH (L)	0,65	0,59	1,09	0,32	-0,804	2,102
pH (Q)	-9,02	0,66	-13,59	0,00	-10,647	-7,398
T x pH	-0,60	0,84	-0,72	0,50	-2,656	1,454

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

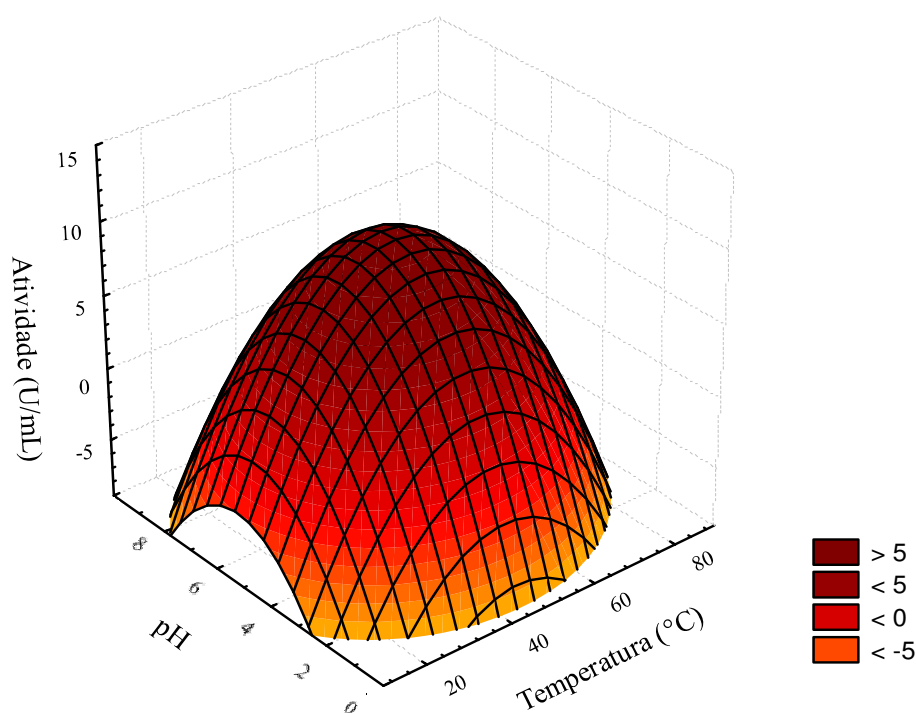
Em negrito estão os valores estatisticamente significativos

Tabela 21. ANOVA para a atividade da lipase parcialmente purificada em função da temperatura e do pH.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	775,3665	p-1 (3)	155,0733	54,97240	4,35
Resíduo	16,92558	n-p (7)	2,820930		
Total	792,29	n-1 (10)			

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

Os gráficos de superfície de resposta estão representados na **Figura 36** e demonstram que as faixas centrais de temperatura e pH são as que levam a maior atividade lipolítica, corroborando com o apresentado para o extrato bruto, quanto ao pH e temperatura ótima de atividade (**Figura 28** e **Figura 30.B**). Analisando o gráfico de superfície de resposta, pode-se observar que o pico do gráfico se encontra nas coordenadas 45°C e pH 5,5, sendo estas as condições determinadas como melhores para a atividade da lipase parcialmente purificada.

**Figura 36.** Superfície de resposta para o planejamento fatorial delineado para as variáveis temperatura (°C) e pH, para a lipase parcialmente purificada do filtrado produzido por FSm.

4.9.3 Termoestabilidade da lipase parcialmente purificada

Neste experimento a enzima parcialmente purificada foi incubada por 0, 15, 30, 60, 90, 120, 180 minutos em temperaturas constantes de 60°C, 70°C e 80°C, e dosadas como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero) e representados graficamente (**Figura 37**). Essa amostra se mostrou estável durante o tempo de incubação testado nas temperaturas de 60° e 70°C, e alcançou a T_{50} após 45 minutos de incubação a 80°C.

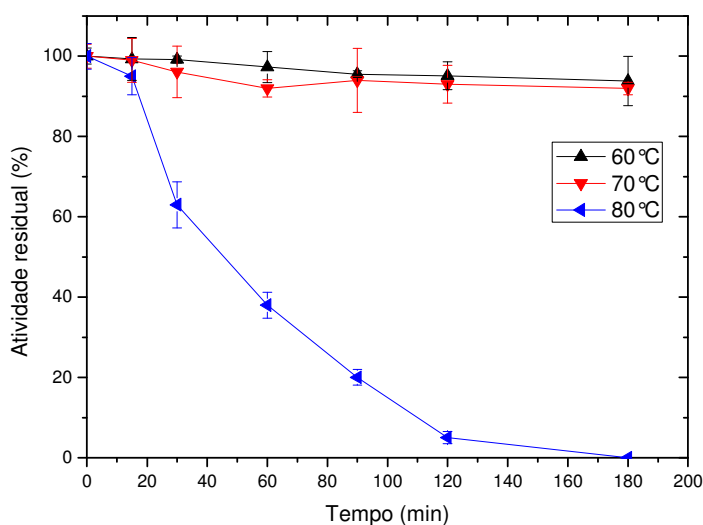


Figura 37. Termoestabilidade das lipases parcialmente purificada em função do tempo de incubação. A amostra parcialmente purificada foi incubada em temperaturas de 60°, 70° e 80°C por tempos variando de 0 a 180 minutos e depois submetidos a ensaio enzimático nas condições ótimas de atividade.

4.9.4 Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da lipase parcialmente purificada

Muitas atividades enzimáticas são influenciadas por íons metálicos, e algumas enzimas são consideradas metaloenzimas. Com o objetivo de testar a ação de diferentes sais, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade da lipase parcialmente purificada essa amostra foi ensaiada conforme descrito em material e métodos, e ao meio reacional foi adicionado soluções de EDTA, β -mercaptoetanol, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, BaCl_2 , CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NaBr , NH_4Cl , NH_4F , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, todos na concentração final de 1mM.

A maioria dos compostos testados pouco influenciou na atividade lipolítica da amostra (**Tabela 22**), havendo apenas uma ativação de cerca de 5% na presença de Mn^{2+} , Na^+ e NH_4^+ . A enzima foi parcialmente inibida por $CoCl_2$, NaH_2PO_4 e $HgCl$, nas proporções de 10%, 15% e 50%, respectivamente.

Tabela 22. Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade da lipase parcialmente purificada

Composto (1 μ mol)	Atividade residual (%)
Controle	100 $\pm$ 1,1
EDTA	99,35 $\pm$ 0,0
β -mercaptoetanol	95,36 $\pm$ 0,2
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	101,71 $\pm$ 0,0
BaCl	98,94 $\pm$ 1,5
$CaCl_2$	98,14 $\pm$ 1,9
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	89,79 $\pm$ 0,6
HgCl	47,88 $\pm$ 2,8
KCl	102,52 $\pm$ 1,7
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	96,82 $\pm$ 2,6
$MnCl_2 \cdot 6H_2O$	107,29 $\pm$ 0,9
NaCl	106,50 $\pm$ 0,9
NaBr	106,50 $\pm$ 0,2
NH_4Cl	106,76 $\pm$ 0,9
NH_4F	106,50 $\pm$ 0,2
$Pb(C_2H_3O_2)_2 \cdot 3H_2O$	102,11 $\pm$ 0,9
KH_2PO_4	101,25 $\pm$ 0,9
NaH_2PO_4	86,74 $\pm$ 3,3
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	100,52 $\pm$ 0,2
$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	101,71 $\pm$ 1,1

4.9.5 Constantes cinéticas da lipase parcialmente purificada

Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$, assim como as eficiências catalíticas da lipase parcialmente purificada frente ao substrato *p*-nitrofenilpalmitato estão presentes na

Tabela 23 e suas representações gráficas na **Figura 38**. De acordo com os resultados essa lipase, para esse substrato, segue o modelo de Michaelis-Menten, o que pode ser comprovado pelo valor de n (1,26) obtido através do programa SigrafW (Leone *et al.*, 2005).

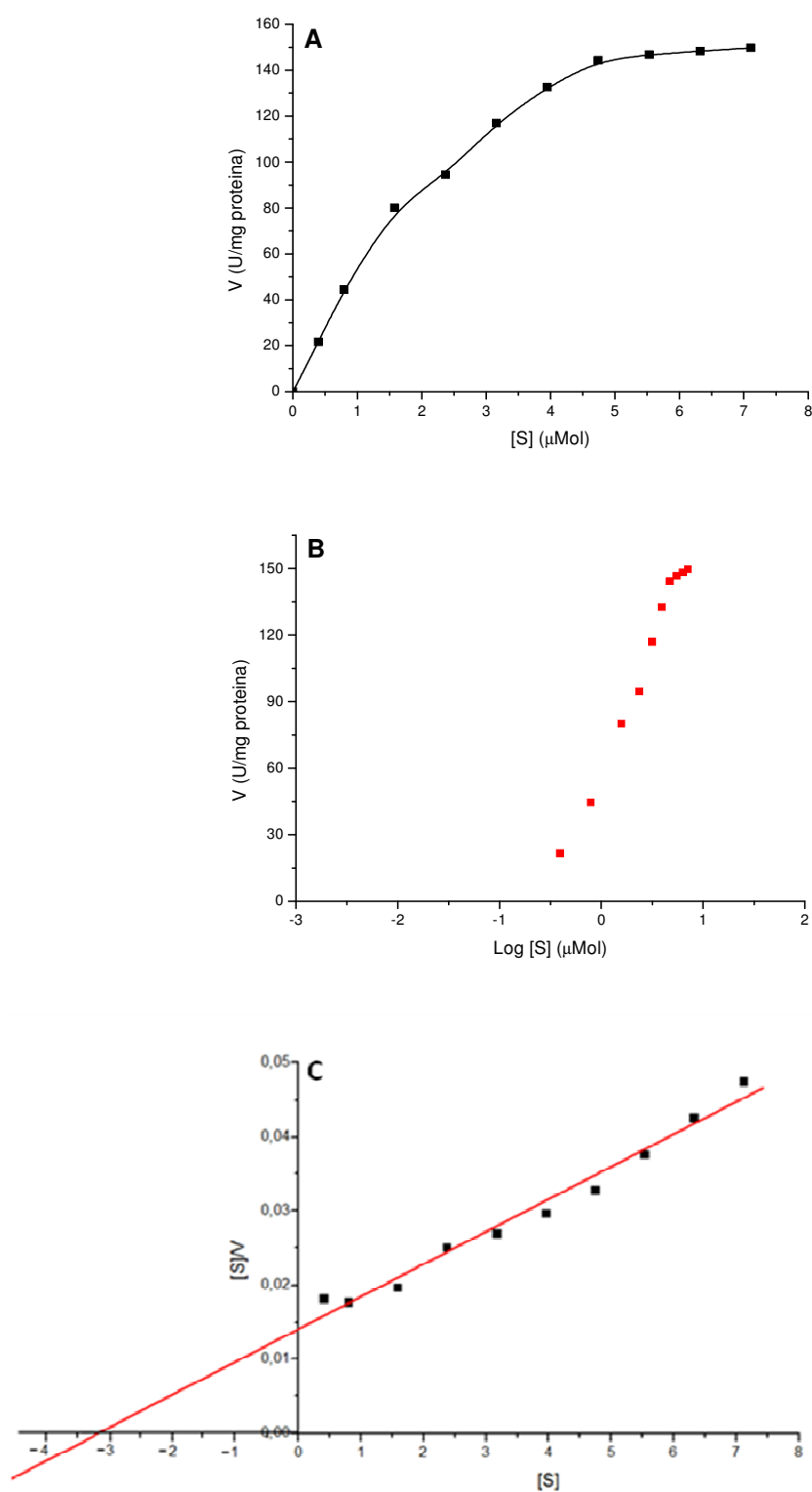


Figura 38. Representação gráfica do K_M (μmol) e da $V_{\text{máx}}$ (U/mg proteína) da lipase parcialmente purificada frente ao substrato *p*-nitrofenilpalmitato. Michaelis-Menten (A), SigrafW (B) e plot de Hanes (C).

Tabela 23. Análises cinéticas da lipase parcialmente purificada de *B. brongniartii*

Procedimento	K_M (μMol)	$V_{\text{máx}}$ (U/mg prot.)	$V_{\text{máx}}/K_M$	n
SigrafW	2,055	185	90,02	1,268
Hanes	3,2	227	70,94	-

4.10 Estudos de imobilização e purificação de uma lipase de baixa massa molecular produzida por FSm pelo fungo *B. brongniartii*

Esta etapa do trabalho consistiu em estudar a lipase que ficava imobilizada após o primeiro procedimento cromatográfico – eluição em DEAE-Celulose. Para tanto, a imobilização foi realizada em Batch, utilizando agitador de rolos para movimentação do sistema, na proporção de 1g de suporte úmido pré-equilibrado em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, para cada 10 mL de extrato bruto. O suporte com a enzima adsorvida foi chamado de derivado.

4.10.1 Imobilização da segunda lipase presente no extrato bruto de *B. brongniartii*

Com a finalidade de estudar a cinética de imobilização da enzima, foi misturado 50 mL de extrato bruto, equilibrado com tampão Tris-HCl pH 7,0, concentração final de 50 mM, a 5 g de DEAE-Celulose. Essa suspensão foi mantida sob agitação constante, em agitador de rolos. Foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante a cada 30 minutos, por 4 horas. Observa-se que após 180 minutos houve a interação de 90% das lipases com o suporte (**Figura 39**).

Decorrido o tempo de adsorção, o derivado foi submetido a soluções de NaCl, em diferentes concentrações (1, 2 e 4 M) para a remoção da lipase anteriormente estudada, outras possíveis lipases (não estudadas) e outras proteínas (**Tabela 24**), restando adsorvido ao suporte apenas a segunda lipase presente no extrato bruto. Permaneceram retidos com atividade no suporte 51% das lipases presentes no extrato bruto. O fator de purificação foi de 5,2.

Com a finalidade de eluir a enzima da resina, uma amostra de 1g do derivado foi colocada em 10 mL de uma solução de Triton X-100 1% em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. A

suspensão foi mantida sob agitação em agitador de rolos por 30 minutos. Esse procedimento permitiu que 59% da lipase imobilizada em DEAE-Celulose fosse eluída do suporte (**Tabela 25**).

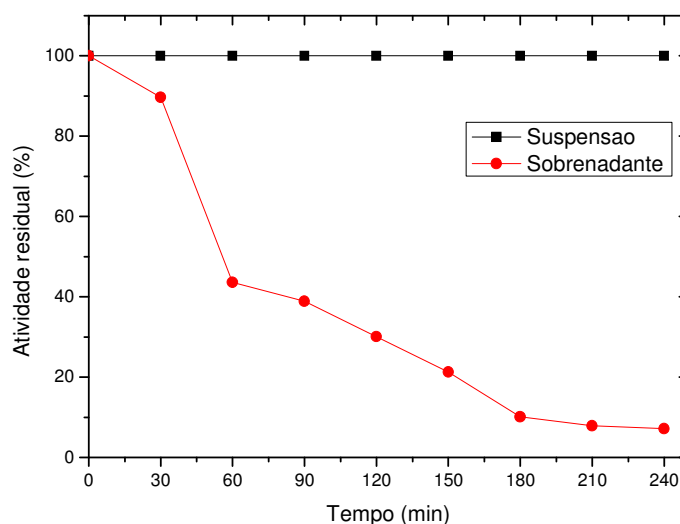


Figura 39. Cinética de imobilização das lipases em DEAE-Celulose.

Tabela 24. Purificação e tratamento do derivado

	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)	Fator de purificação (vezes)
Bruta	50	602,56	50,26	11,99	-	-
Sobrenadante (240 min)	50	1,78	28,13	0,06	0,29	0,01
Tratamento do derivado						
NaCl 1M	20	106,05	11,65	9,11	17,60	0,76
NaCl 2M	20	64,12	2,99	21,43	10,64	1,79
NaCl 4M	20	8,96	2,56	3,51	1,49	0,29
	Massa (g)	Atividade total (U)	Proteína Total (mg)*	Atividade específica (U/mg proteína)	Retenção no suporte (%)	Fator de purificação (vezes)
Derivado	5	307,53	4,93	62,38	51,04	5,20

* Proteína total foi obtida por subtração da proteína total do sobrenadante e dos tratamentos com NaCl (1, 2 e 4M) da proteína total do extrato bruto.

Tabela 25. Dessorção da lipase do suporte DEAE-Celulose com Triton X-100 1%

	Atividade total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg proteína)	Recuperação (%)
Derivado	61,51	0,99	62,38	-
Triton 1%	36,33	0,66*	55,11	59,06

* Proteína foi determinada pelo método de Cadman, Bostwick, e Eichberg (1979)

4.10.2 Eletroforese da lipase imobilizada em condições denaturantes (SDS-PAGE)

Após os procedimentos anteriores o derivado e a enzima solúvel em Triton 1% foram submetidos à eletroforese em condições denaturantes. Para tanto se optou por realizar a eletroforese em gel em tubo, na presença de uréia, conforme descrito em material em métodos. As amostras apresentaram apenas uma banda em gel SDS-PAGE (**Figura 40.A**), sendo considerada portanto uma amostra pura. Essa banda apresentou-se com cerca de 22,12 kDa (**Figura 40.B**).

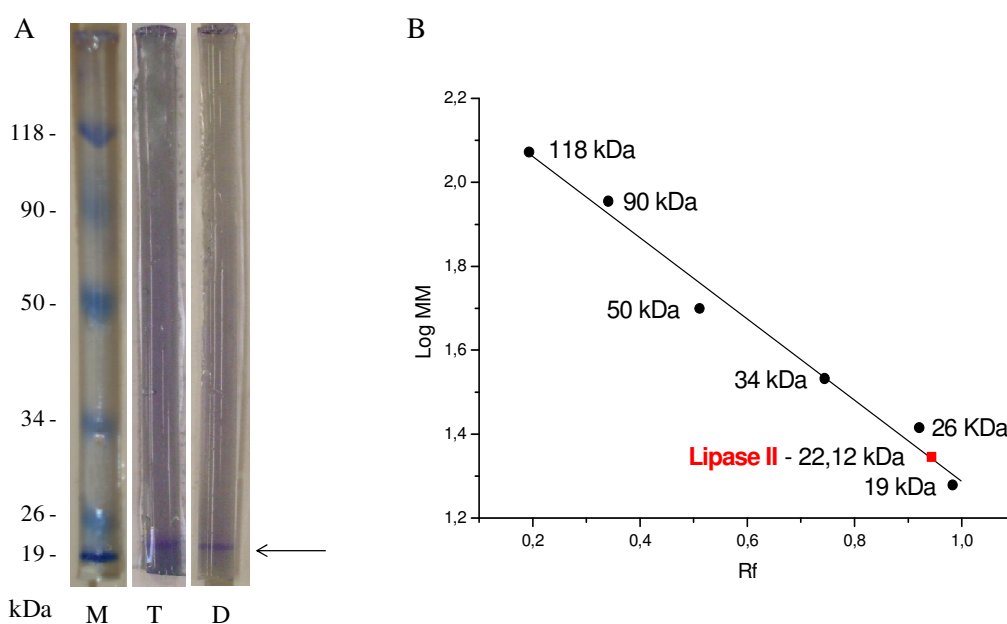


Figura 40. Eletroforese e representação logarítmica da massa molecular da lipase II de *Beauveria brongniartii* imobilizada e purificada em DEAE-Celulose. (A) SDS-PAGE 10% corado com *Coomassie Brillante Blue*; (B) Determinação do massa molecular em SDS-PAGE. M- Marcador de massa molecular; T- Lipase eluída com Triton 1%; D- Derivado; (←) banda correspondente à lipase II.

4.10.3 Otimização das condições de reação do derivado através de delineamento fatorial

Foi realizada uma análise de regressão para testar a influência das variáveis temperatura (T) e pH na atividade da lipase II imobilizada em DEAE-Celulose. Para tanto, optou-se por um planejamento fatorial de dois níveis, composto por quatro pontos centrais (0) e dois pontos externos (α), em um total de 12 experimentos, conforme descrito em material e métodos.

Os resultados experimentais foram avaliados através de uma análise de regressão em decorrência de uma equação (**Eq uação 4**) de atividade lipolítica (U/g de derivado) em função da temperatura (T) e pH.

$$\text{Lipase (U/g de derivado)} = 65,24 - 19,51 \cdot (T)^2 - 31,10 \cdot (\text{pH})^2$$

Equação 4

O valor de R e R^2 para a equação é de 0,98 e 0,96 respectivamente. O teste F mostrou uma significância de $p < 0,05$, o que indica que o modelo utilizado reflete em uma relação entre a temperatura e pH de reação da lipase.

O resultado da atividade lipolítica está representado na **Tabela 26** indicando a média e o desvio padrão da atividade enzimática obtida através do planejamento realizado em duplicata. Verifica-se que a maior atividade lipolítica se dá nos pontos centrais, sendo maior no experimento de número 11, com 68,23 U/g de derivado.

Os valores de p , que avaliam a significância e contribuição de cada parâmetro do modelo equacional estatístico, assim como os coeficientes de regressão dos parâmetros estão indicados na **Tabela 27**, e indicam significância dos termos quadráticos da temperatura e do pH. O resultado da ANOVA, assim como o teste $F_{\text{calculado}}$ e o valor de F_{tabelado} estão apresentados na **Tabela 28**, e demonstra que o modelo é preditivo e estatisticamente válido, pois $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi altamente significativo e maior que F_{tabelado} .

Os gráficos de superfície de resposta estão representados na **Figura 41** e demonstram que as faixas centrais de temperatura e pH são as que levam a maior atividade lipolítica, corroborando com o apresentado para o extrato bruto, quanto ao pH e temperatura ótima de atividade (**Figura 28** e **Figura 30.B**). Analisando o gráfico de superfície de resposta, pode-se observar que o pico do gráfico se encontra nas coordenadas 55°C e pH 5,5, sendo estas as condições determinadas como ótimas para a atividade da lipase parcialmente purificada.

Tabela 26. Atividade lipolítica em U/g do derivado em função da temperatura e pH através do DCCR.

Experimento	T (°C)	pH (pH)	Atividade (U/g de derivado)
1	-1 (30)	-1 (3,0)	16,10 ±0,32
2	-1 (30)	+1 (8,0)	16,22 ±0,66
3	+1 (70)	+1 (8,0)	10,28 ±0,48
4	+1 (70)	-1 (3,0)	10,45 ±0,36
5	-1,414 (21,7)	0 (5,5)	16,14 ±0,78
6	+1,414 (78,3)	0 (5,5)	39,05 ±0,24
7	0 (50)	-1,414 (1,96)	7,32 ±0,14
8	0 (50)	+1,414 (9,04)	1,51 ±0,01
9	0 (50)	0 (5,5)	61,54 ±0,28
10	0 (50)	0 (5,5)	65,01 ±0,44
11	0 (50)	0 (5,5)	68,23 ±0,36
12	0 (50)	0 (5,5)	66,18 ±0,68

Os símbolos X1 e X2 representam, respectivamente, as variáveis temperatura e pH de reação.

Tabela 27. Coeficientes de regressão para a atividade da lipase imobilizada em função da temperatura e do pH.

	Coeficiente	Erro Padrão	t	p	Limite de confiança -95%	Limite de confiança +95%
Intercepto	65,24	3,47	18,81	0,00	56,75	73,73
T (L)	2,60	2,45	1,06	0,33	-3,40	8,60
T (Q)	-19,51	2,74	-7,11	0,00	-26,22	-12,80
pH (L)	-1,03	2,45	-0,42	0,69	-7,03	4,97
pH (Q)	-31,10	2,74	-11,34	0,00	-37,81	-24,39
T x pH	-0,07	3,47	-0,02	0,98	-8,56	8,41

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

Em negrito estão os valores estatisticamente significativos

Tabela 28. ANOVA para a atividade da lipase imobilizada em função da temperatura e do pH.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F _{calculado}	F _{tabelado}
Regressão	7429,6	p-1 (3)	1485,911	30,88307	4,35
Resíduo	288,7	n-p (7)	48,11410		
Total	7718,2	n-1 (10)			

Tabela obtida através do software Statistica 8.0.

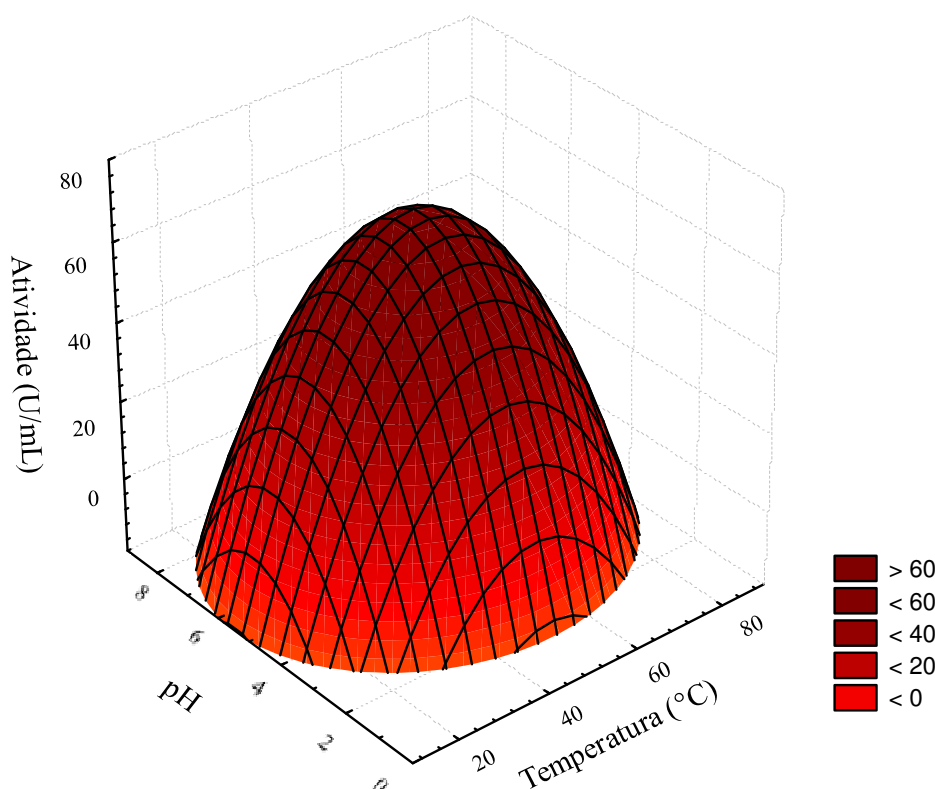


Figura 41. Superfície de resposta para o planejamento fatorial delineado para as variáveis temperatura (°C) e pH, para a lipase do filtrado produzido por FSm que foi imobilizada.

4.10.4 Termoestabilidade do derivado e efeito da adição de glicerol 20% na estabilidade térmica

Com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica do derivado, comparado ao extrato bruto, as amostras foram incubadas por diferentes tempos, de 0 a 240 minutos, a 70°C, e dosadas em seguida, conforme descrito em Material e Métodos. Posteriormente mostrou-se interessante avaliar a estabilidade térmica do derivado, comparado à enzima livre (eluída com Triton 1%) e ao extrato bruto, à temperatura de 75°C. Além disso, se optou por estudar o efeito da adição de glicerol 20% à suspensão de derivado, na estabilidade térmica. Para tanto, essas amostras foram incubadas por até 240 minutos, em temperatura constante de 75°C, e dosadas como descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade em relação ao controle (tempo zero) e representados graficamente.

Conforme se pode constatar na **Figura 42.A**, o derivado mostrou-se totalmente estável a 70°C, assim como o extrato bruto, não alcançando a T_{50} nos tempos de incubação testados. A 75°C, entretanto, o derivado mostrou-se menos estável que o extrato bruto, mas mais estável que a mesma lipase livre (lipase II livre em Triton 1%) (**Figura 42.B**). A adição de glicerol 20% à suspensão de derivado aumentou a

estabilidade do derivado nessa temperatura, mostrando-se mais estável que o extrato bruto. A 75°C, portanto, as amostras do extrato bruto, derivado, lipase II livre e derivado adicionado de glicerol 20% alcançaram a T₅₀ após 77, 25, 9 e 101 minutos, respectivamente.

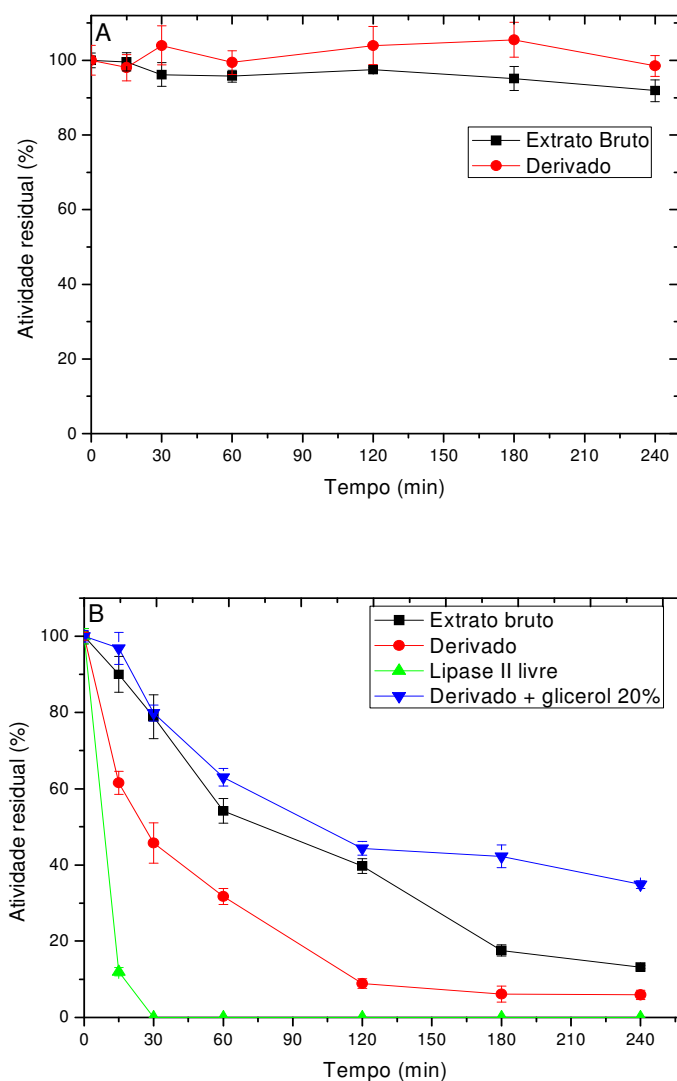


Figura 42. Termoestabilidade da lipase imobilizada em DEAE-Celulose. Estabilidade à 70°C do extrato bruto e do derivado (A); estabilidade a 75°C do extrato bruto, do derivado, da lipaseII livre e do derivado adicionado de glicerol 20% (B). As amostras foram incubadas nas respectivas temperaturas, por tempos variando de 0 a 240 minutos e depois submetidos a ensaio enzimático nas condições ótimas de atividade.

4.10.5 Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade do derivado

Com o objetivo de testar a ação de diferentes sais, EDTA e β -mercaptoetanol na atividade do derivado essa amostra foi lavada cinco vezes com água MiliQ e submetida a ensaio enzimático conforme descrito em Material e Métodos. Ao meio reacional foi

adicionado soluções de EDTA, β -mercaptoetanol, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, BaCl , CaCl_2 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl , KCl , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl , NaBr , NH_4Cl , NH_4F , $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, todos na concentração final de 1mM.

A maioria dos compostos testados pouco influenciou na atividade lipolítica da amostra (**Tabela 29**), não havendo ativação efetiva na presença de nenhum sal. A enzima foi parcialmente inibida por MgCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, NaCl e HgCl , nas proporções aproximadas de 10%, 10%, 20% e 50%, respectivamente.

Tabela 29. Efeito de compostos metálicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade do derivado

Composto (1 μ mol)	Atividade residual (%)
Controle	100 $\pm$ 2,7
EDTA	97,46 $\pm$ 1,7
β -mercaptoetanol	99,62 $\pm$ 0,9
$\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100,31 $\pm$ 2,9
BaCl	101,92 $\pm$ 2,8
CaCl_2	96,00 $\pm$ 1,6
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	93,38 $\pm$ 2,7
HgCl	48,65 $\pm$5,4
KCl	90,45 $\pm$ 3,6
MgCl₂ . 6H₂O	88,61 $\pm$1,4
$\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	94,46 $\pm$ 2,7
NaCl	81,99 $\pm$3,8
NaBr	97,92 $\pm$ 2,6
NH_4Cl	98,08 $\pm$ 1,3
NH_4F	102,39 $\pm$ 2,2
$\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	97,00 $\pm$ 3,9
KH_2PO_4	96,00 $\pm$ 3,6
NaH_2PO_4	95,46 $\pm$ 2,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	94,38 $\pm$ 1,1
Zn(NO₃)₂ . 6H₂O	88,07 $\pm$3,0

4.10.6 Constantes cinéticas do derivado

Os valores de K_M e $V_{m\acute{a}x}$, assim como as efici\^ncias catal\^ticas da lipase imobilizada em DEAE-Celulose frente ao substrato *p*-nitrofenilpalmitato est\^o presentes na **Tabela 30** e suas representa\^oes gr\^ficas na **Figura 43**.

Tabela 30. An\^lises cin\^ticas da lipase de *B. brongniartii* imobilizada em DEAE-Celulose

Procedimento	K_M (uMol)	$V_{m\acute{a}x}$ (U/mg prot.)	$V_{m\acute{a}x} / K_M$	n
SigrafW	1,26	90,95	72,18	1,064
Lineweaver e Burk	1,12	90,74	81,02	-
Hanes	1,165	92,82	79,67	-

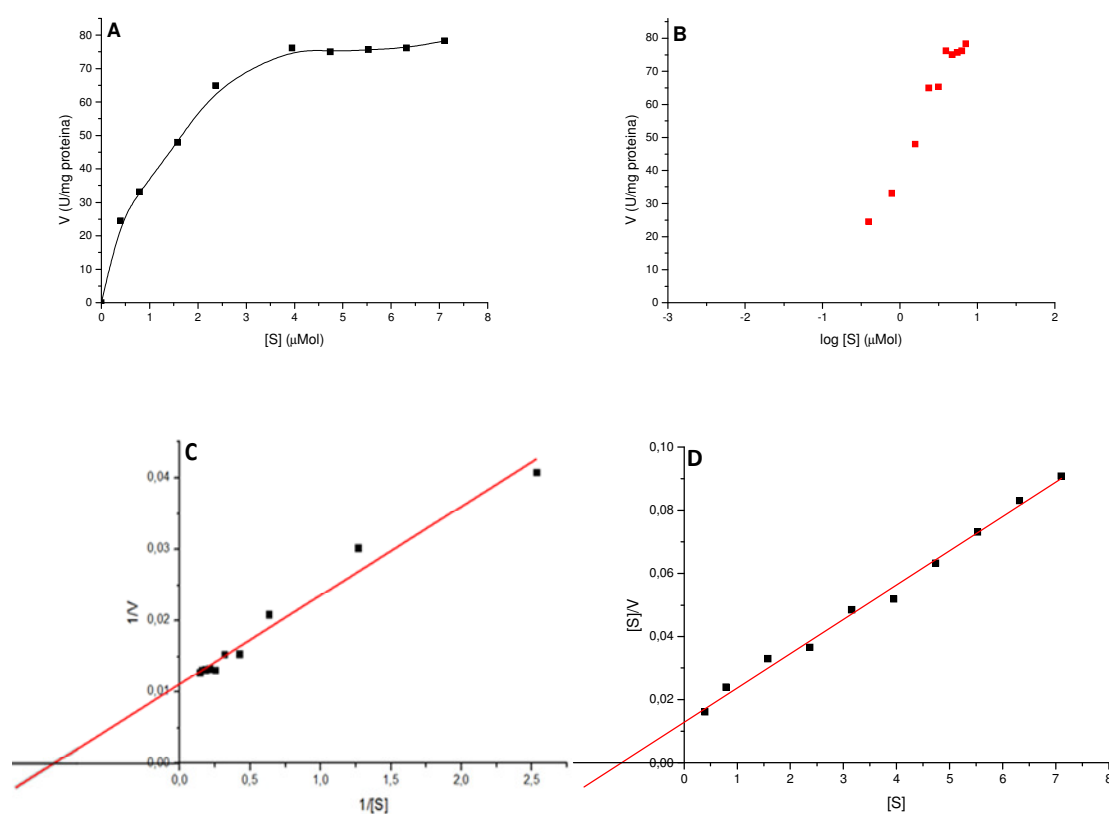


Figura 43. Representa\^ao gr\^fica do K_M (μmol) e da $V_{m\acute{a}x}$ (U/mg prote\^ina) da lipase parcialmente purificada frente ao substrato *p*-nitrofenilpalmitato. Michaelis-Menten (A), SigrafW (B), plot de Lineweaver e Burk (C) e plot de Hanes (D).

5. DISCUSSÃO

Os fungos, por serem microrganismos eucariontes, dispõem de estruturas celulares que possibilitam a secreção de suas enzimas e outros metabólitos para o exterior celular, o que facilita a identificação e purificação dessas enzimas (Trevisan, 2004). As lipases são enzimas de grande interesse industrial produzidas por muitos microrganismos, em especial os eucariotos. A grande maioria das lipases comerciais é de origem microbiana. Sharma, Chisti e Banerjee (2001) listam diversos organismos produtores de lipases estudados até o ano de sua revisão. Microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados em diversos habitats incluindo esgoto industrial, indústrias de processamento de óleo vegetal, fábrica de laticínios, solo contaminado com óleo, sementes de oleaginosas (Sztajer; Maliszewska; Wieczorek, 1988 *apud* Sharma; Chisti; Banerjee, 2001), pilhas de decomposição, fontes termais (Wang *et al.* 1995).

Neste contexto, tornam-se interessante a busca por novas cepas fúngicas produtoras do metabólito de interesse. Para tanto, a bioprospecção mostra-se como uma ferramenta importante. Das duas amostras de solo e serragem coletadas do depósito de óleos e gorduras para a produção de biodiesel, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP foram isolados 36 fungos com características morfológicas diferentes. Em trabalhos semelhantes realizados em nosso laboratório, Silva (2009) isolou 19 fungos de três amostras coletadas em três diferentes regiões do Estado de São Paulo, assim como, Facchini (2010) isolou 27 cepas de 17 amostras, também retiradas de diferentes regiões do Estado. Do mesmo modo, Michelin (2009) isolou sete fungos de amostras retiradas da Floresta USP-Ribeirão Preto. Comparada a estes, a bioprospecção aqui realizada revelou uma amostra muito rica em biodiversidade de fungos filamentosos. Estes fungos foram submetidos a um *screening* para identificar cepas lipolíticas.

Segundo Gupta *et al.* (2003) um *screening* de microrganismos produtores de lipases é convencionalmente feito em placas contendo meio agar/tributirina, entretanto, a zona de hidrólise de tributirina formada no meio é indicativa tanto da atividade de lipase quanto de esterase. O uso de meio de cultivo agar/óleo de oliva é eficiente para identificar colônias produtoras de lipases (Gupta *et al.*, 2003). Das 36 cepas isoladas a maioria (23) cresceu em ambos os meios utilizados, revelando seu potencial para a produção de lipases. Os fungos que cresceram apenas em meio com tributirina possivelmente produzem apenas esterases e não lipases verdadeiras. Por outro lado, o crescimento de alguns fungos em meio com óleo de oliva e não em meio com tributirina, não pode ser justificado pela ausência de uma esterase específica, visto que, as lipases são esterases, e

geralmente são capazes de hidrolisar tributirina. O que pode ter ocorrido é que o meio apenas com tributirina foi muito simples para o crescimento desses fungos, enquanto que o meio com óleo de oliva pode ter oferecido melhores condições nutricionais para os microrganismos crescerem.

Lima (2004), com um experimento semelhante usando óleo de oliva, selecionou três cepas fúngicas de um total de 36, e todas as cepas bacterianas (11 no total) que foram testadas como produtoras de lipase. Colen, Junqueira e Moraes-Santos (2006) observaram com um experimento em placas que de 59 cepas fúngicas isoladas a partir da Savana brasileira, 25 apresentaram halos lipolíticos. Diversos microrganismos, dentre bactérias, leveduras e fungos, têm a capacidade de produzir e secretar grandes quantidades de lipases (Trevisan, 2004). Jaeger e Reetz (1998) listaram algumas bactérias e fungos que já foram estudados e têm suas lipases utilizadas comercialmente. Dentre estes, destacam-se as bactérias *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* e *Chromobacterium viscosum* e os fungos *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei*.

A capacidade de secretar grandes quantidades de enzimas para o meio de cultivo de alguns fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de fermentação em larga escala, purificação enzimática e técnicas de biologia molecular (Agger *et al.*, 2002; Peixoto, 2004). A seleção de microrganismos produtores de enzimas de interesse biotecnológico mostra-se como uma etapa importante nos processos de pesquisa onde serão empregadas. Sabe-se que cada espécie de microrganismos produz um *pool* enzimático característico, contudo, a quantidade absoluta e relativa dessas enzimas varia bastante não apenas de uma espécie para outra, mas também entre diferentes linhagens da mesma espécie (Michelin, 2009). Portanto, a realização de um *screening* foi de extrema importância para a seleção do microrganismo foco desse estudo. Para tanto, foi realizada uma seleção em fermentação submersa, na qual foram utilizadas as cepas isoladas e pré-selecionadas anteriormente, assim como, espécies pertencentes ao cepário do laboratório.

Das cepas estudadas *Beauveria brongniartii* apresentou uma somatória de atividade total (atividade intracelular mais a atividade extracelular) maior que as demais, sendo, portanto, escolhido para a continuidade dos estudos. Outras cepas mostraram potencial para a produção de lipases, dentre elas as cepas isoladas nesse trabalho, USP 19, 22 e 28, que podem ser o foco de outros estudos com lipases em nosso laboratório.

Não se tem registro na literatura do estudo com lipases de *Beauveria brongniartii*, contudo Mustafa e Kaur (2010) estudaram a produção de diversas enzimas extracelulares de *B. bassiana*, dentre elas a lipase, sendo este o único trabalho atual sobre enzimas de um fungo do gênero *Beauveria*. Este fator estimula novas pesquisas sobre enzimas com aplicação biotecnológica produzidas por *Beauveria* sp.

Todavia, há vários estudos com lipases produzidas por espécies do gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, dois dos gêneros testados nesse experimento. Dentre essas se podem citar *Aspergillus niger* (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Saxena *et al.*, 2003; Pinna *et al.*, 2005; D'Annibale *et al.*, 2006; Colin; Baigori; Pera, 2010), *P. chrysogenum* (Bancerz; Ginalska; Fiedurek, 2005), *P. citrinum* (D'Annibale *et al.*, 2006), *P. cyclopium*, *P. simplicissimum*, *P. expansum* e *P. camembertii* (Saxena *et al.*, 2003). Existem ainda estudos com lipases de outros fungos entomopatogênicos, como os fungos *Metarhizium anisopliae* (Silva *et al.*, 2005), *Isaria fumosoroseus* (Ali; Huang; Ren, 2009) e *Nomuraea rileyi* MJ (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010).

Posterior a escolha do microrganismo de estudo, se optou por verificar qual a melhor temperatura de crescimento do fungo em placa e em FSm e de produção de lipase em FSm. *B. brongniartii* apresentou melhor crescimento e produção de lipases a 25° e a 30°C, sendo escolhida a temperatura de 30°C para a continuidade dos estudos. Lima *et al.* (2003) estudaram o efeito da temperatura na produção de lipases por *Penicillium aurantiogriseum*, obtendo maior produção quando o fungo foi cultivado a 29°C. Na literatura são relatados microrganismos produtores de lipases que são cultivados em diferentes temperaturas, de acordo com as suas características, como por exemplo, os fungos *Penicillium chrysogenum*, cultivado a 20°C (Bancerz; Ginalska; Fiedurek, 2005), *Nomuraea rileyi* MJ, cultivado a 25°C (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010), *Fusarium solani* (Maia *et al.*, 1999) e *Botryosphaeria* sp. (Messias *et al.*, 2009) cultivados a 28°C, *Bjerkandera adusta* R59 (Bancerz; Ginalska, 2007) e *Aspergillus niger* (Colin; Baigori; Pera, 2010) cultivados a 30°C.

Grandes quantidades de enzimas específicas são requeridas em processos industriais. A produção enzimática deve ser máxima, para tanto são necessários estudos de otimização do meio de cultivo. A segunda parte do presente trabalho consistiu em estudar a produção de lipases pelo fungo *B. brongniartii* em FSm, averiguando as condições de cultivo e estudando a composição do meio de cultura.

O primeiro passo para o estudo de otimização do meio de cultivo em FSm foi a análise da produção de lipases em cinco diferentes meios de cultivo, que variam na

composição de íons, no tipo e na concentração de fonte de nitrogênio. *B. brongniartii* apresentou maior produção lipolítica intracelular em meio SR (Rizzatti *et al.*, 2001) e Khanna (Khanna; Sundari; Kumar, 1995) e maior produção extracelular em meio Khanna.

O tempo de incubação de um microrganismo e o estado de aeração do meio possui uma elevada influência na produção de enzimas. A incubação por um curto período pode não resultar na produção máxima da enzima de interesse. Da mesma forma, cultivos por um longo período podem levar ao esgotamento dos nutrientes, levando a um declínio da produção enzimática além da morte celular (Pelczar; Chan; Krieg, 1996). Na literatura, a maioria dos fungos que produz lipases é cultivada sob agitação dada a natureza da enzima (Ginalska; Bancierz; Kowalska-Kornilowicz, 2004; Bancierz; Ginalska; Fiedurek, 2005).

O fungo *B. brongniartii* secretou maiores níveis de lipases após 72 horas de cultivo, sob agitação orbital de 100 rpm. Nos estudos realizados com lipases fúngicas, os microrganismos, quando cultivados em meio líquido, são incubados na maioria das vezes sob agitação, como nos estudos feitos por Hiol *et al.* (2000) que mantinham as culturas de *Rhizopus oryzae* sob agitação de 100 rpm, Bancierz, Ginalska e Fiedurek (2005), que cultivaram *P. chrysogenum* a 150 rpm, Messias *et al.* (2009), que cultivaram *Botryosphaeria* sp. a 180 rpm e Shu, Yang e Yan (2007) que cultivaram *A. niger* em agitador a 250 rpm, enquanto Colin, Baigori e Pera (2010) cultivaram a cepa MYA 135 dessa mesma espécie a 200 rpm.

Shu, Yang e Yan (2007) utilizam o tempo de 80 horas de cultivo para *A. niger*. Hiol *et al.* (2000) registraram o tempo de 96 horas como melhor tempo de cultivo para a produção e secreção de lipases de *R. oryzae*. Bancierz, Ginalska e Fiedurek (2005), D'Annibale *et al.* (2006) e Messias *et al.* (2009) cultivaram, respectivamente, *P. chrysogenum*, *Candida cylindracea* e *Botryosphaeria* sp por 120 horas. Cada microrganismo possui seu melhor tempo de crescimento para a produção e secreção de lipases, o que pode ainda ser influenciado pelas condições de cultivo e composição do meio de cultura.

A fonte de nitrogênio é outro fator que influencia tanto no crescimento como na produção enzimática do microrganismo. *B. brongniartii* teve crescimento e produção lipolítica semelhante tanto na presença de extrato de levedura (original do meio de cultivo Khanna) como na presença de peptona, com níveis superiores em meio contendo peptona. Na presença de acetato de amônio, a produção enzimática também foi considerável, com 17% de produção lipolítica a mais para as enzimas intracelulares, mas com 20% a menos

de produção extracelular comparado ao controle (extrato de levedura). Na presença de fontes inorgânicas de nitrogênio houve pouca ou nenhuma produção lipolítica em ambos os extratos.

Na literatura encontramos um estudo semelhante com a levedura *Yarrowia lipolytica* (Fickers *et al.*, 2004). Nesse trabalho a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi triptona seguida de peptona. Em fontes inorgânicas de crescimento a produtividade de lipases dessa levedura foi de 0,35% da atividade registrada para triptona. Lima *et al.* (2003) demonstraram que para *P. aurantiogriseum* a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi sulfato de amônio 1% em solução de sais. Para o fungo *P. chrysogenum* a melhor fonte de nitrogênio para a produção de lipases foi uréia, sendo esta cerca de 15 vezes maior comparado ao fungo cultivado com extrato de levedura ou peptona (Bancerz; Ginalska; Fiedurek, 2005).

A fonte de lipídios também influencia no crescimento do microrganismo, assim como, na indução da produção de lipases. Óleos de origens diferentes apresentam uma composição distinta de ácidos graxos, assim como concentrações diferentes dos mesmos lipídios, podendo influenciar de formas distintas o crescimento fúngico e a produção de lipases. Quando *B. brongniartii* foi cultivado em diferentes óleos, teve crescimento maior em óleo de pequi, dendê, nim, girassol, mamona, gergelim e soja, comparado ao controle, óleo de oliva. Quanto à atividade de lipase, esta foi maior que o controle na maioria dos meios para as lipases intracelulares, enquanto que para o extrato extracelular, a maior produção se deu com óleo de canola.

Vários autores reportam a produção de lipases por fungos e bactérias em cultivo submerso suplementado com óleo de oliva. Rahman *et al.* (2006) testaram a influência de diferentes óleos e de triglicerídeos sintéticos na produção de lipase pela bactéria *Pseudomonas sp*, obtendo como melhor resultado o cultivo em meio suplementado com óleo de oliva 0,5%. Lima *et al.* (2003) estudaram o uso de óleo de oliva, soja, milho e girassol, obtendo maior produção de lipases por *P. aurantiogriseum* com óleo de oliva. Bancerz, Ginalska e Fiedurek (2005) fizeram um experimento semelhante para o fungo *P. chrysogenum*, obtendo melhor resultado utilizando óleo de milho, óleo de oliva ou trioleína como fonte indutora da produção de lipases. D'Annibale *et al.* (2006) estudaram para *C. cylindracea* o efeito da adição de óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja ao meio de cultivo, obtendo melhor produção de lipases em meio suplementado com óleo de oliva. Colin, Baigori e Pera (2010) também obtiveram maior produção de lipases por *A. niger* MYA 135 utilizando óleo de oliva em comparação aos óleos de uva, soja, milho e

girassol. Messias *et al.* (2009) obtiveram melhor produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* em meio suplementados com ácido oléico.

A adição de outras fontes de carbono, como carboidratos, ao meio de cultivo junto à fonte de carbono de origem lipídica pode induzir maior crescimento micelial, podendo melhorar a produção da enzima de interesse devido ao aumento de massa. A adição de 0,5% de D-glucose no meio de cultura dobrou a secreção de lipases no meio de cultivo contendo óleo de canola 1%.

Bancerz, Ginalska e Fiedurek (2005) estudaram a influência da adição de diversos carboidratos ao meio de cultura para a produção lipolítica de *P. chrysogenum*, obtendo melhor resultado quando o fungo foi cultivado em meio contendo sacarose 1,0% seguido de D-glucose 1,0%. Rahman *et al.* (2006) fizeram um experimento semelhante para a bactéria *Pseudomonas sp.*, entretanto a adição de D-glucose 1,0% ao meio de cultura diminuiu a produção de lipases em mais de 50% em relação ao meio sem adição de carboidrato.

O efeito da concentração da fonte de nitrogênio, de óleo e de D-glucose na produção de lipase pode ser estudado de forma pontual, variando a concentração de um destes, enquanto a concentração dos demais fica fixa. Ou podem ser estudados conjuntamente, através de um delineamento fatorial. Nesse trabalho, onde as variáveis foram estudadas em dois níveis, utilizando pontos externos e repetições de pontos centrais, a variável óleo de canola mostrou efeito positivo na produção de lipases, levando a um ganho na produção lipolítica, enquanto que o efeito das demais variáveis foi negativo, levando a uma diminuição na produção da enzima. De acordo com Rodrigues e Iemma (2005) um modelo é preditivo e estatisticamente válido se o $F_{\text{calculado}}$ é maior que o F_{tabelado} , e neste delineamento experimental o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} , mostrando um modelo estatisticamente válido.

Um novo meio de cultivo foi definido a partir desse experimento, contendo óleo de canola 3,5%, D-glucose 0,25%, peptona 0,05% e solução de sais de Khanna 5%. Estudos sobre a concentração da fonte de carbono e fonte de nitrogênio são mais comumente apresentados de forma individuais na literatura, como apresenta Colin, Baigori e Pera (2010), que estudaram o efeito de diferentes concentrações de óleo de oliva na produção lipolítica de *Aspergillus niger* MYA 135, obtendo como melhor a concentração de 2,0% de óleo de oliva.

O planejamento fatorial pode ser utilizado com diversas finalidades desde que se utilizem variáveis independentes e contínuas. Camacho *et al.* (2009) utilizaram o

planejamento fatorial para avaliar o efeito da temperatura e do NaCl na produção de lipases pela arqueobactéria *Haloarcula marismortui*. Chennupati *et al.* (2009) fizeram estudos de otimização de meio de cultura através de planejamento fatorial para a produção de lipase pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. Nesse trabalho os autores estudaram a variação da concentração de amido, farinha de soja e óleo de soja no meio de cultivo.

Nas últimas décadas, fungos, bactérias e leveduras têm sido testados em FES exibindo diferentes estratégias metabólicas em FES e em FSm. A comparação direta de vários parâmetros, tais como taxa de crescimento, produtividade ou volume de atividade, são favorecidos pela FES na maioria dos casos (Hölker; Höfer; Lenz, 2004). A terceira parte do presente trabalho objetivou o estudo da produção de lipases por *B. brongniartii* em FES.

O primeiro passo para estudar a produção de lipases em FES foi a seleção do substrato de cultivo. Os resultados obtidos para *B. brongniartii* demonstram que, de todos os substratos testados, farelo de trigo foi o melhor para a produção de lipases. FES é um tipo de meio de cultivo no qual é comum a utilização de resíduos agroindustriais como substrato de crescimento do microrganismo e produção do metabólito de interesse.

Alguns trabalhos com lipases de fungos filamentosos cultivados em FES podem ser encontrados na literatura, como *R. rhizopodiformis* e *R. pusillus*, que foram cultivados em bagaço de cana-de-açúcar e torta de oliva (1:1) (Cordova *et al.*, 1998). *A. niger* que foi incubado em farelo de trigo e em torta de gergelim (3:1) (Mala *et al.*, 2007), em farelo de trigo e bagaço de milho (Damaso *et al.*, 2008) e em uma mistura 1,25:2,5:6,25 de trigo moído, torta de coco e farelo de trigo (Edwinoliver *et al.*, 2010). *R. chinensis* (Sun; Xu, 2008) e *P. verrucosum* (Kempka *et al.*, 2008) foram cultivados em vários tipos de substratos, sendo os melhores uma mistura de farinha de trigo e farelo de trigo (3:2) para *R. chinensis* e farelo de soja para *P. verrucosum*.

O tempo de crescimento micelial e da maior produção enzimática varia entre as diferentes espécies de fungo, mas também de acordo com o tipo de cultivo, FSm ou FES, e com a fonte de carbono. Para determinar o melhor tempo de cultivo para a produção de lipases por *B. brongniartii* em FES, este foi cultivado por 10 dias em farelo de trigo, obtendo como melhor tempo de cultivo 7 dias, com atividade de 11 U/mL, ou 165 U/g de substrato.

Os fungos *R. rhizopodiformis* e *R. pusillus*, que foram cultivados em FES com bagaço de cana-de-açúcar e torta de oliva (1:1) obtiveram melhor produção lipolítica após

24 horas de crescimento, com atividade de cerca de 80 e 20U/g de substrato, respectivamente (Cordova *et al.*, 1998). *A. niger* (Mala *et al.*, 2007) e *R. chinensis* (Sun; Xu, 2008), que foram incubados, respectivamente, em farelo de trigo e em torta de gergelim (3:1) e em farinha de trigo e farelo de trigo (3:2), produziram, ambos, maior quantidade de lipases após 72 horas de cultivo, com uma atividade de cerca de 400U/g de substrato. *A. niger* cultivado em trigo moído, torta de coco e farelo de trigo (1,25:2,5:6,25) também obteve maior produção de lipases após 72 horas de cultivo, mas com produção de cerca de 600 U/g (Edwinoliver *et al.*, 2010). *P. verrucosum* (Kempka *et al.*, 2008), que foi cultivado em farelo de soja, teve maior produção de lipases, cerca de 75U/g de substrato, após 156 horas de crescimento.

O meio utilizado para umedecer o substrato de crescimento em FES também pode influenciar no crescimento do microrganismo e na produção enzimática. Esse meio pode variar de água deionizada a soluções de sais complexas. Quando diferentes soluções foram testadas como meio para umedecer o farelo de trigo, a produção enzimática não sofreu grandes variações, optando-se, portanto, por continuar utilizando água deionizada para esse fim. Facchini (2010) realizou um experimento semelhante para a produção de xilanases e celulasas por *A. japonicus*, obtendo como melhor solução para umedecer o substrato em FES a solução de sais de Khanna para xilanases e sais SR para celulasas.

Outro fator que pode influenciar no crescimento fúngico e produção enzimática é a adição de uma fonte extra de nitrogênio. Quando este fator foi testado observou-se que nenhuma das fontes de nitrogênio testadas foi capaz de aumentar a produção lipolítica, o que demonstra que o farelo de trigo que compõe o meio é uma fonte de nitrogênio eficiente para o crescimento e produção lipolítica do fungo em estudo. Facchini (2010) obteve maior produção de xilanases e celulasas por *A. japonicus* quando adicionou peptona à FES. Sun e Xu (2008) obtiveram maior produção de lipase por *R. chinensis* adicionando extrato de levedura ao meio de cultivo em estado sólido composto por farelo de trigo.

Outro fator examinado foi a adição de 10% de óleo ao meio de cultivo em estado sólido, com a finalidade de induzir maior produção lipolítica. Como resultado, obtivemos que a adição de 10% de óleo não aumentou cerca de 70% a produção de lipase comparado ao meio sem adição de óleo. Damaso *et al.* (2008) testaram a influência da adição de óleo de oliva em FES para um mutante de *A. niger*, obtendo como melhor resultado a adição de óleo de oliva 2% ao farelo de trigo.

Com a finalidade de otimizar a produção de lipases em FES foi realizado um delineamento fatorial, onde as variáveis independentes e contínuas testadas foi farelo de trigo, água e óleo nim. Neste experimento observou-se que a quantidade de farelo de trigo e água influenciam diretamente a produção de lipases, sendo que a água tem influência positiva sobre essa produção, o que demonstra a importância da umidade do meio para a produção enzimática do microrganismo em estudo. Neste delineamento experimental o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} , mostrando um modelo estatisticamente válido. Um novo meio de cultivo foi determinado com este experimento, com farelo de trigo, água e óleo nim na proporção de 4:9:0,4. Kempka *et al.* (2008) utilizaram o método de superfície de resposta para otimizar a produção de lipases de *P. verrucosum* em fermentação em estado sólido. Nesse trabalho ele variou a temperatura de incubação e a umidade do meio obtendo como melhor condição para a produção enzimática 27,5°C de temperatura de incubação e 55% de umidade no meio de cultivo.

A comparação entre os dois métodos de fermentação para a produção de lipases por *B. brongniartii* demonstra maior produção de lipases por FES, entretanto a quantidade de proteína no extrato enzimático bruto é muito alta, o que faz com que a atividade específica do extrato bruto extracelular de FSm seja 9 vezes maior que em FES, tornando o extrato de FSm mais conveniente para os estudos de purificação e imobilização. Além disso, a melhor produção de lipases em FES se dá após 7 dias de cultivo, enquanto que para FSm se dá após 3 dias de cultivo, sem a necessidade de se controlar a umidade relativa do ar.

A quarta parte deste trabalho foi caracterizar os extratos brutos. O primeiro passo foi averiguar a temperatura ótima de atividade enzimática. Para o extrato intracelular produzido por FSm e para o extrato produzido por FES a melhor temperatura de ensaio foi 60°C e para o extrato extracelular produzido por FSm foi de 70°C, entretanto se levar em consideração o erro experimental não houve diferença estatisticamente significativa em relação à temperatura de 60°C.

A temperatura ótima para a atividade enzimática varia com a fonte da enzima. Bancierz, Ginalska e Fiedurek (2005) demonstraram que para as lipases de *P. chrysogenum* a temperatura ótima de atividade se dá a 30°C. Mahadik *et al.* (2002) e Shu, Yang e Yan (2007) relataram a temperatura de 45°C como sendo a melhor para a atividade lipolítica extracelular do fungo *A. niger*. Lima (2004) estudou a atividade de lipases do fungo *P. aurantiogriseum*, cuja atividade foi maior quando o ensaio foi realizado na faixa de temperatura de 50° a 70°C. Bancierz e Ginalska (2007) obtiveram

para a lipase de *Bjerkandera adusta* a atividade ótima à 45°C. Park *et al.* (2007) obtiveram 60°C como temperatura ótima para a lipase da bactéria *Burkholderia* sp. Para o fungo entomopatogênico *Nomuraea rileyi*, Supakdamrongkul, Bhumiratana e Wiwat (2010) observaram que a melhor temperatura de atividade foi 35°C.

A estabilidade térmica da enzima é uma característica requerida em diversos processos industriais que utilizam altas temperaturas. As lipases intra e extracelulares de *B. brongniartii* produzidas por FSm são totalmente estáveis a 70°C por 180 minutos de incubação, sendo que alcançam um T₅₀ após 180 e 35 minutos, respectivamente. Já as lipases produzidas por FES se mostraram estáveis a 60°C no tempo de incubação, mas alcançaram um T₅₀ após 90 e 7 minutos de incubação a 70° e 80°C, respectivamente. A alta termoestabilidade das lipases de *B. brongniartii* indica que as enzimas desse fungo podem ser de interesse para indústrias que utilizam essas condições de temperatura nos processos de produção.

As enzimas de *B. brongniartii* mostraram-se mais termoestáveis do que as lipases de diversos fungos registrados na literatura, como as de *Rhizopus oryzae* (Hiol *et al.*, 2000) que é termoestável apenas a 35°C, *Burkholderia* sp. (Park *et al.*, 2007), que é termoestável a 50°C, as lipases de *Mucor hiemalis f. hiemalis* (Hiol *et al.*, 1999) que é termoestável a 45°C. *B. ribis* produz lipases estáveis a 60°C após 180 minutos de incubação, com atividade residual de 60% e a 65°C atinge um T₅₀ após 110 minutos de incubação (Messias *et al.*, 2009). *N. rileyi* mantém cerca de 70% de sua atividade após 60 minutos de incubação a 55°C (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010).

Outra variável estudada foi o efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática. Os três extratos brutos produzidos por *B. brongniartii* apresentaram maior atividade quando tamponadas em pHs ácidos, no intervalo de pH de 4,5-6,0. As lipases de *P. chrysogenum* foram mais ativas no intervalo de pH de 5,0 a 7,0 (Bancerz; Ginalska e Fiedurek, 2005). A lipase purificada de *A. niger* apresentou maior atividade em pH 7,0 (Shu; Yang; Yan, 2007). As enzimas lipolítica da bactéria *Burkholderia* sp. são mais alcalinas e têm pH ótimo de 8,5 (Park *et al.*, 2007). As lipases do fungo *N. rileyi* também são demonstradas como alcalinas, tendo pH ótimo igual a 8,0, mas com mais de 80% de atividade na faixa de pH de 7,0 a 9,0 (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010).

Quanto à estabilidade ao pH das lipases de *B. brongniartii*, após duas horas de incubação, as lipases intracelulares produzidas por FSm mantiveram mais de 80% de atividade em toda a faixa de pH estudada, exceto o pH 8,0, chegando próxima da T₅₀ nesse pH. A lipase extracelular manteve mais de 80% de atividade após incubação nos

pHs de 5,0 a 7,5. Já as lipases produzidas por FES se mostraram estáveis em toda a faixa de pH testada.

As lipases de várias espécies de fungos possuem diferentes faixas de estabilidade ao pH como no caso das lipases de *Fusarium solani* que é estável por uma hora em pH de 7,5 a 8,5 (Maia *et al.*, 1999), de *R. oryzae*, que é estável por uma hora em pH de 5,0 a 7,5 (Hiol *et al.*, 2000), de *B. adusta*, que são estáveis na faixa de pH de 6,0 a 9,0 (Bancerz; Ginalska., 2007) e de *N. riley*, estável por uma hora nos pHs de 7,0 a 9,0 (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010).

Muita atenção tem sido dada à estabilidade de lipases na presença de solventes orgânicos, pois é sabido que a presença desses desempenham um papel importante na performance enzimática (López *et al.*, 2004). A estabilidade das lipases na presença de solventes orgânicos é de grande interesse, uma vez que são nessas condições que se realizam as reações de esterificação (Karadzic *et al.*, 2006). Fatores como polaridade, hidrofobicidade e tamanho da cadeia carbônica do solvente devem ser levados em consideração, pois se tratam de características envolvidas nesse processo (López *et al.*, 2004; Bancerz; Ginalska, 2007).

A lipases produzidas por FSm, tanto intra como extracelulares, foram estáveis em praticamente todos os solventes, exceto em acetonitrila e isopropanol, com atividade residual de 70% e 53%, para as lipases intracelulares, e 80% e 65% para as extracelulares, respectivamente nesses dois solventes. Contudo, as lipases produzidas por FES foram inativadas por quase todos os solventes estudados, mantendo atividade residual apenas em DMSO, acetona e metanol, na proporção de 74%, 27% e 14%, respectivamente. Lipases estáveis a solventes orgânicos como as produzidas em FSm por *B. brongniartii* são interessantes para processos de esterificação (Karadzic *et al.*, 2006), enquanto que lipases instáveis a esses compostos, como as produzidas em FES por *B. brongniartii*, não são úteis para esses processos.

Em estudos feitos com lipases de *Bjerkandera adusta*, após 24 horas de incubação em temperatura ambiente resultaram em enzimas com perda de 60% de atividade na presença de DMSO, 70% em acetona e em butanol, 80% em metanol, acetonitrila e propanol, 85% em etanol (Bancerz; Ginalska, 2007). As lipases de *B. ribis* foram instáveis em acetona, butanol, isopropanol, hexano e tolueno, mantendo menos de 30% de atividade residual após incubação nesses solventes. Essas enzimas mantiveram 68% de atividade após incubação em isooctano e 100% de atividade após incubação em metanol 50% e etanol 50% (Messias *et al.*, 2009). As lipases de *Burkholderia* sp. foram estáveis

em hexano, metanol e etanol, com atividade residual de 103%, 95% e 88%, respectivamente (Park *et al.*, 2007).

A atividade lipolítica pode ser mensurada por diferentes métodos, sendo os mais comuns os colorimétricos, principalmente aqueles que utilizam *p*-nitrofenil-ésteres como substrato (Hasan; Shah; Hameed, 2009). É comum se encontrar trabalhos que utilizam também a análise da hidrólise de substratos naturais da lipase através do método titulométrico, que mensura a quantidade de ácido graxo liberado após hidrólise enzimática. No presente trabalho foi analisada a atividade lipolítica do extrato extracelular produzido por FSm e do extrato produzido por FES frente a diferentes óleos vegetais. O extrato produzido por FES obteve maior atividade lipolítica que o produzido por FSm frente a todos os óleos testados, sendo os melhores o óleo de oliva e de girassol. Para o extrato produzido por FSm a melhor atividade se deu em trioleína, óleo de soja, milho e girassol.

Polizelli *et al.* (2008) estudaram a hidrólise de diferentes óleos vegetais pela lipase da semente de *Pachira aquática*, obtendo maior hidrólise com óleo de oliva. A lipase do fungo *Bjerkandera adusta* hidrolisou melhor óleo de milho comparado aos óleos de girassol, soja, oliva e uva (Bancerz; Ginalska, 2007). A lipase da cepa F044 de *Aspergillus niger* obteve melhor resultado com óleo de oliva, seguido de óleo de tungue e semente de algodão (Zheng-Yu; Jiang-Ke; Yun-Jun, 2007). As enzimas de *Nomuraea rileyi* foi mais hábil em hidrolisar óleo de coco e óleo de mamona e trilaurina e tripalmitina, em comparação a outros óleo naturais e triglicerídeos sintéticos (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010).

A próxima parte deste trabalho foram os estudos de purificação e imobilização das lipases existentes no extrato bruto extracelular produzido por FSm. Através dos procedimentos aqui utilizados, foi possível identificar dois tipos de lipases. A primeira lipase identificada foi parcialmente purificada através de cromatografia em DEAE-Celulose seguida por cromatografia em Octyl-Sepharose. Esse protocolo de purificação resultou em uma amostra purificada 5 vezes (fator de purificação igual a 5,12), com recuperação de 15,65% em relação ao extrato bruto. Estudos em eletroforese em condições denaturnantes coradas com Coomassie Blue permitiram a visualização de duas proteínas. Em eletroforese em gel nativo foi possível visualizar essas duas proteínas. Quando este gel foi colocado sobre um gel de Agarose contendo óleo de oliva e o corante Victória Blue B, e incubado a 60°C *overnight*, revelou que apenas a proteína que ficou na parte superior do PAGE teve atividade lipolítica. Essa banda foi recortada, macerada e

ressuspendida em tampão de corrida de SDS-PAGE, e submetida à eletroforese. Esse procedimento revelou que a proteína de maior massa molecular da amostra é a que tem atividade de lipase, sendo a outra considerada um contaminante da amostra. Portanto, os procedimentos cromatográficos aqui utilizados isolaram e purificaram parcialmente uma lipase de aproximadamente 47 kDa.

Muitas aplicações industriais de lipases não requerem preparações homogêneas da enzima, entretanto certo grau de pureza permite uma utilização mais eficiente. Além disso, a purificação de enzimas permite sua caracterização cinética, a determinação da sua sequência primária de aminoácidos e a determinação de sua estrutura tridimensional através da obtenção de cristais (Saxena *et al.*, 2003). Os métodos de purificação de lipases dependem do microrganismo, do meio e condições de cultivo e das características da enzima. Deste modo, protocolos de purificação podem variar mesmo quando cepas diferentes do mesmo microrganismo, ou condições de cultivo diferentes forem utilizadas (Lima, 2004).

Zheng-Yu, Jiang-Ke e Yun-Jun (2007) purificaram uma lipase de *A. niger* com massa molecular entre 35-40 kDa, utilizando precipitação com sulfato de amônio, seguido por cromatografia em DEAE-Sepharose e filtração em gel em Sephadex G-75, o que resultou em um fator de purificação de 73,71 vezes, com 33,99% de recuperação. Recentemente Supakdamrongkul, Bhumiratana e Wiwat *et al.* (2010) publicaram estudos que incluem a purificação de uma lipase de aproximadamente 97 kDa de *N. rileyi*. Neste trabalho o extrato bruto foi submetido inicialmente à precipitação com sulfato de amônio 80%, seguida de filtração em gel em Sephacryl S-100, resultando em um fator de purificação de 23,9 vezes, com recuperação de 1,69%. Borkar *et al.* (2009) purificaram uma lipase extracelular da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* de aproximadamente 29 kDa, utilizando precipitação com sulfato de amônio, seguida de cromatografia em Fenyl-Sepharose e Mono Q e obteve 7,5% de recuperação e um fator de purificação de 98 vezes. Como se pode observar com esses exemplos, a precipitação com sulfato de amônio é um procedimento muito utilizado como primeiro passo do processo de purificação, variando muito de trabalho para outro na recuperação da enzima e no fator de purificação. Este procedimento, assim como precipitação com acetona e etanol, também foi testado em nosso trabalho (dados não mostrados), entretanto não apresentou boa recuperação, nem aumentou o fator de purificação.

Uma segunda forma lipase do filtrado de *B. brongniartii* foi imobilizada e purificada em um único passo utilizando a resina DEAE-Celulose como suporte. Esse

processo de imobilização e purificação foi estudado em Batch. Geralmente enzimas em solução não são muito estáveis em temperaturas elevadas nem ao tempo de armazenamento. Enzimas imobilizadas são conhecidas por serem estáveis por maiores tempos que a livre, a temperaturas elevadas, e ao tempo de armazenamento. Essa característica, junto à possibilidade de reuso dos derivados enzimáticos por mais de um ciclo, tem despertado interesse e motivado pesquisas com diversas enzimas com aplicação industrial (Silva, 2009). A cinética de imobilização das lipases de *B. brongniartii* mostra que após 60 minutos em contato com a resina, mais de 50% das lipases do filtrado haviam se ligado a ela, e após 180 minutos quase todas as lipases faziam parte do derivado. A velocidade de adsorção da proteína ao suporte varia com o tipo de proteína que se estuda e com as características do suporte. Giltlesen, Bauer e Adlercreutz (1997) verificaram que a lipase comercial de *Candida rugosa* foi quase totalmente adsorvida em matriz pó de polipropileno antes de 100 minutos de contato com o suporte. Gupta *et al.* (2005) purificaram uma lipase de *Burkholderia multivorans* em um único passo utilizando imobilização em matriz de polipropileno. Neste trabalho 50% da lipase presente no extrato bruto foi imobilizada antes de 15 minutos. Cunha *et al.* (2009) estudaram a separação e imobilização de lipases produzidas por *P. simplicissimum* utilizando suportes hidrofóbicos. No primeiro procedimento, que utilizou Butyl-Agarose como suporte, 50% das lipases foram adsorvidas antes de 10 minutos.

Decorrido o tempo de imobilização das lipases de *B. brongniartii*, o derivado foi tratado com soluções de NaCl 1,2 e 4 M, com a finalidade de dessorver a enzima anteriormente estudada e outras proteínas que pudessem estar ligadas ao suporte por interação iônica. Esse procedimento resultou em um derivado que continha 51% das lipases presentes no extrato bruto ativas. O detergente Triton X-100, na concentração de 1%, foi capaz de dessorver cerca de 50% da enzima imobilizada, sendo essa denominada lipase livre. Quando a lipase livre e o derivado foram submetidos à eletroforese foi possível observar apenas uma banda protéica em cada gel, as quais correspondiam na altura de migração no gel, portanto foram consideradas a mesma enzima. Essa lipase teve massa molecular estimada de 22,12 kDa.

A caracterização da lipase parcialmente purificada e da lipase imobilizada de *B. brongniartii* iniciou-se com estudos da temperatura e pH de atividade. Para esse processo optou-se por estudar as duas variáveis conjuntamente, levando em consideração o efeito de uma sobre a outra. Foram feitas matriz de planejamento experimental, abrangendo as faixas de temperatura e pH de 22-78°C e 1,96-9,04, respectivamente. Ambas as enzimas

tiveram maior atividade em temperaturas e pHs intermediários, dentro da faixa estudada. Nos dois delineamentos experimentais o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} , mostrando um modelo estatisticamente válido. Analisando os gráficos de superfície de resposta, pode-se observar que o pico do gráfico está nas coordenadas 45°C-pH 5,5, para a lipase parcialmente purificada, e 55°C-pH 5,5, para a imobilizada. Kempka *et al.* (2008) fizeram um estudo semelhante com a lipase produzida por *P. verrucosum* e obteve como melhor condição de ensaio a temperatura de 44°C e pH igual a 7,0, tendo as maiores atividade nos pHs centrais e pouca influência da temperatura, na faixa em que estudou.

A termoestabilidade das duas lipases também foi estudada. A lipase parcialmente purificada mostrou estabilidade semelhante ao extrato bruto, nas temperaturas de 60° a 80°C, sendo estável por 180 minutos a 60° e 70°C e atingindo um T_{50} após 40 minutos a 80°C. A termoestabilidade do derivado a 70°C foi estudada em comparação ao extrato bruto. O derivado foi estável por 240 minutos a 70°C, assim como o extrato bruto. Num segundo estudo da termoestabilidade do derivado comparou-se sua estabilidade a do extrato bruto, da lipase II livre e do derivado adicionado de 20% de glicerol, à temperatura de 75°C. O derivado mostrou-se mais estável que a enzima livre nessa temperatura, sendo que alcançou um T_{50} após 25 minutos de incubação, enquanto que a lipase livre alcançou um T_{50} com menos de 15 minutos. Entretanto, o derivado foi menos estável que o extrato bruto (T_{50} igual a 90 minutos), possivelmente por haver algum componente no extrato bruto que protege essa enzima. No intuito de aumentar a estabilidade do derivado foram adicionados 20% de glicerol ao mesmo. O glicerol age com um protetor da enzima, mantendo-a estável por mais tempo em temperaturas altas. A adição de glicerol ao derivado fez com que este tivesse uma termoestabilidade maior a 75°C, tendo um T_{50} de 110 minutos.

Kumar *et al.* (2005) purificaram uma lipase da bactéria *Bacillus coagulans* que CE mostrou termoestável a 70°C por 25 minutos, alcançando um T_{50} após esse tempo de incubação. Saisubramanian *et al.* (2008) purificaram uma enzima lipolítica de *Acinetobacter* sp. que foi estável a 50°C por 60 minutos, e permaneceu com cerca de 40% de atividade a 60°C após 60 minutos de incubação. Borkar *et al.* (2009) purificaram uma lipase de *Pseudomonas aeruginosa* que atingiu um T_{50} após 45 minutos de incubação a 70°C. A lipase purificada do fungo *A. niger* foi estável até a 60°C após uma hora de incubação (Zheng-Yu; Jiang-Ke; Yun-Jun, 2007). Já a lipase de *N. rileyi* mostrou-se estável a 50°C, ficando com aproximadamente 45% de atividade após incubação a 60°C por 60 minutos (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010). Bancercz e Ginalska

(2007), que estudaram a lipase imobilizada e livre de *Bjerkandera adusta*, mostraram que a lipase imobilizada foi mais termoestável que a livre em cerca de 10% após 120 minutos a 75°C, e manteve 30% da atividade após incubação a 80°C, o que não acontece quando a lipase está em solução – não apresenta atividade residual após 120 minutos de incubação a 80°C quando na forma solúvel.

Muitas enzimas são ativadas por íons metálicos, que funcionam como co-fatores, essas enzimas são denominadas metaloenzimas. Outros íons, ao contrário, podem inibir a atividade enzimática, muitas vezes por interferir na estrutura da proteína, como no caso do íon Hg^{2+} , que pode inibir a atividade enzimática atuando sobre sítios tióis presentes no sítio ativo da enzima (Rizzati *et al.*, 2001). A atividade da lipase parcialmente purificada de *B. brongniartii* teve pouca influência por sais, sendo ativada em cerca de 5% na presença de MnCl_2 , NaCl , NaBr e NH_4Cl . Essa enzima foi parcialmente inibida por CoCl_2 , NaH_2PO_4 e HgCl , sendo que este último reduziu em cerca de 50% a atividade lipolítica da enzima. NaCl e NH_4Cl , além de NaN_3 , também ativaram a lipase de *N. rileyi*, mas em proporções diferentes. Essa lipase foi totalmente inibida por CoCl_2 e CsCl (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010). A lipase de *B. brongniartii* imobilizada não foi ativada por nenhum dos sais testados e foi parcialmente inibida por MgCl_2 , $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$, NaCl e HgCl , também sendo este último o que mais reduziu a atividade da enzima (50%). HgCl também inibiu a atividade da lipase de *Rhizopus oryzae*, nesse caso a inibição foi de 74% (Hiol *et al.*, 2000). A lipase de *A. niger* foi ativada em 150% por CaCl_2 , mas foi parcialmente inibida por MnCl_2 , FeCl_2 e ZnCl_2 (Zheng-Yu; Jiang-Ke; Yun-Jun, 2007). A lipase da bactéria *P. aeruginosa*, foi parcialmente inibida por quase todos os íons testados, inclusive Hg^{2+} , mas foi ativada em 7% por Ca^{2+} (Borkar *et al.*, 2009).

Os parâmetros cinéticos das duas lipases estudadas no presente trabalho foram calculados para o substrato sintético *p*-nitrofenilpalmitato (*p*NPP). A lipase parcialmente purificada teve seus parâmetros cinéticos calculados através do programa SigrafW e da representação gráfica de Hanes. Essa lipase obteve K_M e $V_{\text{máx}}$ de 2,055 μmol e 185 U/mg de proteínas, de acordo com o programa SigrafW, e de 3,2 μmol e 227 U/mg, calculado por Hanes, respectivamente. O derivado obteve K_M e $V_{\text{máx}}$ de 1,26 μmol e 90,95 U/mg de proteínas, de acordo com o programa SigrafW, de 1,12 μmol e 90,74 U/mg de proteínas, segundo a representação gráfica de Lineweaver-Burk, e de 1,165 μmol e 92,82 U/mg, calculado por Hanes, respectivamente.

Lipases de diferentes organismos diferem tanto no tamanho quanto nas características, inclusive quanto a seus parâmetros cinéticos. A lipase de *A. niger* pura apresentou para o substrato *p*NPP, K_M e $V_{m\acute{a}x}$, calculado segundo representação de Lineweaver-Burk, de 7,37 mmol/L e 25,91 U/mg de proteína, respectivamente (Zheng-Yu; Jiang-Ke; Yun-Jun, 2007). A lipase purificada de *N. rileyi* apresentou, também segundo a representação gráfica de Lineweaver-Burk, K_M de 2,1 μ mol e $V_{m\acute{a}x}$ de 18,86 U/mg de proteína para a hidrólise *p*NPP (Supakdamrongkul; Bhumiratana; Wiwat, 2010). A lipase de *P. aeruginosa* apresentou, de acordo com a representação gráfica de Lineweaver-Burk, K_M e $V_{m\acute{a}x}$, para o substrato *p*NPP, de 0,37 mmol e 188,6 mol/L/min, e para substrato *p*-nitrofenillaurato, 0,11 mmol e 161,3 mol/L/min, respectivamente (Borkar *et al.*, 2009). Prencreac'h e Baratti (1997) determinaram os parâmetros cinéticos da lipase imobilizada de *Pseudomonas cepacia*s por regressão linear. Esta enzima apresentou para a hidrólise de *p*NPP K_M e $V_{m\acute{a}x}$ de 8,7 mmol e 90,1 U/g, e para hidrólise de *p*-nitrofenilacetato, de 0,9 mmol e 2,9 U/g, respectivamente.

6. CONCLUSÕES

- Neste trabalho foi realizada uma prospecção de fungos filamentosos em área de armazenamento de óleos para a produção de biodiesel, isolando 36 fungos, alguns dos quais com potencial para a produção de lipases.
- Dos fungos estudados para a produção lipolítica, *Beauveria brongniartii* foi o que apresentou excelentes níveis enzimáticos de lipases quando comparado com a literatura.
- A melhor produção enzimática de lipases por *B. brongniartii* em FSm ocorreu com 72 horas de incubação a 100 rpm, a 30°C. A FSm foi otimizada para o meio de cultivo Khanna, com óleo de canola 3,5%, peptona 0,05% e D-glucose 0,25%.
- A FSm nas condições otimizadas apresentou-se como mais adequada à produção de lipases para estudos de purificação e imobilização por apresentar maior atividade específica em relação a FES.
- A melhor produção enzimática de lipases por *Beauveria brongniartii* em FES ocorreu na presença de farelo de trigo como substrato. As melhores condições de cultivo para a produção lipolítica foi 7 dias de incubação, a 30°C com 80% de umidade relativa do ar. A FES foi otimizada para um meio de cultivo contendo 4g de farelo de trigo, 9 mL de água deionizada e 0,4 mL de óleo nim.
- A utilização da FES para a produção de lipases por *Beauveria brongniartii* se mostra interessante para a utilização em processos onde a pureza não seja requerida, pois utiliza um substrato barato e condições de cultivo que exigem menos gastos com energia, já que não há necessidade de estufas com agitador.
- As lipases presentes nos extratos brutos produzidos por *Beauveria brongniartii* apresentaram atividade ótima com temperaturas em torno de 60°C, e com pHs entre 4,5 e 6,0. As lipases produzidas por FSm se mostraram mais termoestáveis que as produzidas por FES nas temperaturas de 60° e 70°C. Quanto a estabilidade ao pH, as lipases intracelulares produzidas por FSm foi estável nos pHs de 2,5 a 7,5, as lipases do filtrado da FSm, foi mais estável nos pHs de 5,5 a 7,5 e as produzidas por FES foram estáveis em toda a faixa de pH testada (pH 2,5-8,0). As lipases produzidas por FSm se mostraram estáveis a maioria dos solventes, enquanto que as produzidas por FES não se mostrou estável em nenhum.

- As lipases de *Beauveria brongniartii* apresentam características desejáveis para aplicações em processos industriais, pois possuem atividade e estabilidade em temperaturas altas, são estáveis em diversos pHs e são estáveis a vários solventes orgânicos.
- Duas lipases diferentes presentes no filtrado de FSm foram identificadas. Uma delas foi parcialmente purificada, apresentando massa molecular de 46,85 kDa.
- Um segundo tipo de lipase de 22,12 kDa foi purificada e imobilizada em um passo utilizando DEAE-Celulose. Esse procedimento é interessante, pois reduz os custos com purificação, além de dar a possibilidade de reuso do catalisador imobilizado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, P.R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. **Mycopathologia**, v. 112, p 35-37, 1990.
- Agger, T.; Petersen, J.B.; O'connor, S.M.; Murphy, R.L.; Kelly, Y.M.; Nielsen, J. Physiological characterization of recombinant *Aspergillus nidulans* strain with different ceA genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase. **J. Biotechnol.**, v. 92, p. 279-285, 2002.
- Aires-Barros, M.R.; Cabral, J.M.S. Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 38, p. 1302-1307, 1991.
- Ali, S.; Huang, Z.; Ren, S.X. Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales). **Biocontrol Sci. Technol.**, v. 19, n. 1, p. 81-89, 2009.
- Almeida, R.V. Clonagem e expressão do gene de uma lipase de *Pirococcus furiosus* em *Escherichia coli*. Dissertação (Mestrado). COPPE/Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Aquarone, E.; Borzani, W.; Lima, U.A. Biotecnologia: tópicos de microbiologia industrial. v. 2. São Paulo: **E. Blücher**, 1990.
- Azevedo, C.M.A. Bioprospecção: Coleta de Material Biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Caderno nº17, 2ª Edição. São Paulo: **Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica**, 2003.
- Bancerz, R.; Ginalska, G.; Fiedurek, J.; Gromada, A. Cultivation conditions and properties of extracellular crude lipase from the psychrotrophic fungus *Penicillium chrysogenum* 9'. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, p. 253-260, 2005.
- Bancerz, R.; Ginalska, G. A novel thermostable lipase from Basidiomycete *Bjerkandera adusta* R59: characterization and esterification studies. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, p. 553-560, 2007.
- Bentes-Gama. Bioprospecção da biodiversidade: princípios e ações para o uso sustentável. Emprapa Rondônia, Rondônia, 2002. Disponível em: <http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/Artigos/bioprospec.htm>. Consultado em 28/02/2010.
- Bertini, L.; Rossi, I.; Zambonelli, A.; Amicucci, A.; Sacchi, A.; Cecchini, M.; Gregori, G.; Stocchi V. Molecular identification of *Tuber magnatum* ectomycorrhizae in the field. **Microbiol. Res.**, v. 161, p. 59-64, 2006.

- Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L.; Vermelho, A.B.; Paiva, C.L.A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R.R.R. (Ed.) *Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: **Editora Interciência**, 2008. 506 p.
- Brígida, A.I.S. **Estudo da imobilização de lipase tipo B de *Candida antarctica* utilizando fibra de casca de coco verde como suporte**. Fortaleza, 2006, 205f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará.
- Borkar, P.S.; Bodade, R.G.; Rao, S.R.; Khobragade, C.N. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Braz. J. Microbiol.**, v.40, p. 358-366, 2009.
- Bornscheuer, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. **Curr. Opinion Biotechnol.**, London, v. 13, n. 6, p. 543-547, 2002.
- Bornscheuer, U.T.; Kazlauskas, R.J. Hydrolases in organic synthesis regio and stereoselective biotransformations. Weinheim: **Wiley –VCH**, 1999.
- Brockman, H.L. General features of lipolysis: reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: Lipases, pp. 1-46. Borgstrom, B.; Brockman, H.L. (Eds.) Amsterdam: **Elsevier Science Publishers**, 1984.
- Brzozowaki, A.M.; Savage, H; Verna, C.S.; Turkenburg, J.P.; Lawson, D.M.; Svendsen, A.; Patkar, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, p. 15071- 15082, 2000.
- Cadman, E.; Bostwick, J.R.; Eichberg, J. Determination of protein by a modified Lowry procedure in the presence of some commonly used detergents. **Anal. Biochem.**, v. 96, p. 21-23, 1979.
- Camacho, R.M.; Mateos, J.C.; Gonzáles-Reynoso, O.; Prado, L.A.; Córdova, J. Production and characterization of esterase and lipase from *Haloarcula marismortui*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 901-909, 2009.
- Carlile, M.J.; Watkinson, S.C. The Fungi. London: **Academic Press Limited.**, 482 p., 1994.
- Chennupati, S.; Potumarthi, R.; Rao, M.G.; Manga, P.L.; Sridevi, M.; Jetty, A. Multiple responses optimization and modeling of lipase production by *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737 using response surface methodology. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, *in press*, 2009.

- Ciardo, D.E.; Schär, G.; Böttger, E.C.; Altwegg, M.; Bosshard, P.P. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44 (1), p. 77-84, 2006.
- Colen, G.; Junqueira, R.G.; Moraes-Santos, T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, n. 8, p. 881-885, 2006.
- Colin, V.L.; Baigori, M.D.; Pera, L.M. Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from *Aspergillus niger* MYA 135. **J. Basic Microbiol.**, v. 50, p. 52-58, 2010.
- Cordova, J.; Nemmaoui, M.; Ismaïli-Alaoui, M.; Morin, A.; Roussos, S.; Raimbault, M.; Benjilali, B. Lipase production by solid state fermentation of olive cake and sugar cane bagasse. **J. Mol. Cat. B: Enzymatic.**, v. 5, p. 75-78, 1998.
- Cunha, A.G.; Fernández-Lorente, G.; Gutarra, M.L.E.; Bevilaqua, J.V.; Almeida, R.V.; Paiva, L.M.C.; Frenández-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Freire, D.M.G. Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 156, p. 563-575, 2009.
- Cygler, M.; Schrag, J.D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1441, p. 205-214, 1999.
- Cygler, M.; Schrag, J.D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Meth. Enzymol.**, Part. A, v. 284, p. 3-27, 1997.
- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M.G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.
- Damaso, M.C.T.; Passianoto, M.A.; Freitas, S.C.; Freire, D.M.G; Lago, R.C.A.; Couri, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Braz. J. Microbiol.**, v. 39, p. 676-681, 2008.
- D'Annibale, A.; Sermanni, G.G., Federici, F.; Petruccioli, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresour. Technol.**, v. 97, p. 1828-1833, 2006.
- Davis, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.121, p. 404-427, 1964.

- Edwinoliver, N.G.; Thirunavukarasu, K.; Naidu, R.B.; Gowthaman, M.K.; Nakajima Kambe, T.; Kamini, N.R. Scale up of a novel tri-substrate fermentation for enhanced production of *Aspergillus niger* lipase for tallow hydrolysis. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 6791-6796, 2010.
- Eggert, T.; Van Pouderoyen, G.; Dijkstra, B.W.; Jaeger, K.E. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. **FEBS Lett.**, v. 502, p. 89-92, 2001.
- Egloff, M.P.; Ransac, S.; Marguet, F.; Rogalska, E.; Van Tilbeurgh, H.; Buono, G.; Cambillau, C.; Verger, R. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In: Malcata, F.X. (Ed.). Engineering of/with lipases. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 1995.
- Facchini, F.D.A. Bioprospecção e produção de enzimas fibrolíticas por *Aspergillus japonicus* com potencial para aplicação em nutrição de ruminantes. Ribeirão Preto, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Bioquímica) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- Fernandes, M.L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. Curitiba, 2007. Dissertação – Doutor em Química, Área: Química orgânica – Universidade Federal do Paraná.
- Ferrato, F.; Carriere, F.; Sarda, L.; Verger, r. A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. **Methods Enzymol.**, v. 284, part B, p. 327-347, 1997.
- Fickers, P.; Nicaud, J.M.; Gaillardin, C.; Destain, J.; Thonart, P. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **J. App. Microbiol.**, v. 96, p. 742-749, 2004.
- Freire, D.M.G.; Castilho, L.R. Lipases em biocatálise. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L.; Vermelho, A.B.; Paiva, C.L.A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R.R.R. (Ed.) Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: **Editora Interciência**, 2008. 506 p.
- Freitas, P. M.; Martin, N.; Silva, D.; Da Silva, R.; Gomes, E. Production and partial characterization of polygalacturonases produced by thermophilic *Monascus* sp N8 and by thermotolerant *Aspergillus* sp N12 on solid-state fermentation. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37 (3), p. 302-306, 2006.

- Gilbert, E.J.; Cornish, A.; Jones, C.W. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **J. Gen. Microbiol.**, v. 137, p. 2223-2229, 1991.
- Giltlesen, T.; Bauer, M.; Adlercreutz, P. Adsorption of lipase on polypropylene powder. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1345, p. 188-196, 1997.
- Ginalska, G.; Bancarz, R.; Kowalska-Kornilowicz, T. A thermostable lipase produced by a new isolated *Geotrichum*-like strain, R59. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 177-182, 2004.
- González-Navarro, H.; Bañó, M.C.; Abad, C. The closed/open model for lipase activation. Addressing intermediate active forms of fungal enzymes by trapping of conformers in water-restricted environments. **Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3174-3183, 2001.
- Gow, N.A.R.; Gadd, G.M. The growing fungus. London. **Chapman; Hall**. 473 p., 1995.
- Gotor, V. Lipases and (R)-oxynitrilases: useful tools in organic synthesis. **J. Biotechnol.**, v. 96, n.1, p. 35-42, 2002.
- Grant, W. D., Mwatha, W. E.; Jones, B. E. Alkaliphiles: Ecology, diversity and applications. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 75, p.255-269, 1990.
- Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Cygler, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. **Protein Science**, v. 3, p. 82-91, 1994.
- Gross, R.A.; Kalra, B.; Kumar, A. Polyester and polycarbonate synthesis by in vitro enzyme catalysis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 55, p. 655-660, 2001.
- Gupta, N.; Rath, P.; Singh, R.; Goswami, V.K.; Gupta, R. Single step purification of lipase from *Burkholderia multivorans* using polypropylene matrix. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 648-653, 2005.
- Gupta, R.; Gupta, N.; Rath, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 763-781, 2004.
- Gupta, R.; Rath, P.; Gupta, N.; Bradoo, S. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 37, p. 63-71, 2003.
- Hanes, C.S. Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. **Biochem. J.**, v. 26, n. 5, p. 1406-1421, 1932.
- Hasan, F.; Shah, A.A.; Hameed, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

- Hasan, F., Shah, A.A.; Hameed, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnol. Adv.**, v.27, p. 782-798, 2009.
- Hawksworth, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycol. Res.**, v. 95, p. 641-655, 1991.
- Hawksworth, D. L.; Kirk, P. M.; Sutton, B. C.; Pegler, D. N. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi (8th Ed.). Wallingford: **CAB International**, 1995, 616 p.
- Henry, T.; Iwen, P.C.; Hinrichs, S.H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **J. Clin. Microbiol.** v. 38 (4), p. 1510-1515, 2000.
- Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis f. hiemalis*. **Enz. Microbial. Technol.**, v. 25, p. 80-87, 1999.
- Hiol, A.; Jonzo, M.D.; Rugani, N.; Druet, D.; Sarda, L.; Comeau, L.C Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme Microbial. Technol.**, v. 26, p. 421-430, 2000.
- Hölker, U.; Höfer, M.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.64, p.175-186, 2004.
- Hölker, U.; Lenz, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8. p. 301 – 306, 2005.
- Holmquist, M. Alpha/Beta-hidrolases fold enzymes: structures, functions and mechanisms. **Curr. Prot. Pep. Sci.**, v. 1, n. 2, p. 209-235, 2000.
- Holwerda, K.; Verkade, P.E.; Willigen, A.H.A. **Recl. Trav. Chim. Pays-Bas**, v. 55, p.43, 1936.
- Iso, M.; Chen, B.; Eguchi, M.; Kudo, T.; Shrestha, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 16 , p 53-58, 2001.
- Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W.; Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- Jaeger, K.E.; Eggert, T. Lipases for biotechnology. **Cur. Opin. Biotechnol.**, v.13, p 390-397, 2002.

- Jaeger, K.E.; Rasanc, S.; Dijkstra, B.W.; Colson, C.; Van Heuvel, M.; Misset, O. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.** 15, p 29-63, 1994.
- Jaeger, K.E.; Reetz, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnol.**, v. 16, p. 396-403, 1998.
- Jaenicke, R. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. **Eur. J. Biochem.**, v. 202, p. 715-728, 1991.
- Jansen, A. E. M., Vaidya, A. M.; Halling, P. Substrate specificity and kinetics of *Candida rugosa* lipase in organic media **Enz. Microb. Technol.**, v. 18, p. 340-346, 1996.
- Karadzic, I.; Masui, A.; Zivkovic, L.I.; Fujiwara, N. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 102(2), p. 82-89, 2006.
- Kempka, A.P.; Lipke, N.L.; Pinheiro, T.L.F., Menoncin, S.; Treichel, H.; Freire, D.M.G.; Di Luccio, M.; Oliveira, D. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* in solid-state fermentation. **Bioprocess. Biosyst. Eng.**, v. 31, p. 119-125, 2008.
- Kessler, P.; Enkerli, J.; Schweizer, C.; Keller, S. Survival of *Beauveria brongniartii* in the after application as a biocontrol agent against the European cockchafer *Melolontha melolontha*. **BioControl.**, v. 49, p. 563-581, 2004.
- Khanna, P.; Sundari, S.S; Kumar, N.J. Production, isolation and partial purification of xylanase from *Aspergillus* sp. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.11, p 242-243, 1995.
- Kim, K. K.; Song, H. K.; Shin, D. H.; Hwang, K. Y.; Suh, S. W. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. **Structure** v. 5, p. 173-185, 1997.
- Kornberg, A. Why purify enzymes? **Methods Enzymol.**, v. 182, p.1-5, 1990
- Krieger, N; Bhatnagar, T.; Baratti, J.C.; Baron, A.M.; Lima, V.M.G.; Mitchell, D.A. Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 42, p. 279-286, 2004.
- Krishna, S.H.; Karanth, N.G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate. A kinetic study. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1547, p. 262-267, 2001.

- Kumar, S.; Kikon, K.; Upadhyay, A.; Kanwar, S.S.; Gupta, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expr. Purif.**, v. 41, p. 38-44, 2005.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p.680-685, 1970.
- Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nystroem, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresour. Technol.**, v. 87, p.167-198, 2003.
- Leone, F.A.; Degreve, L.; Baranauskas, J.A. SIGRAF: A versatile computer program for fitting enzyme kinetics data. **Biochem. Ed.**, v. 20, p. 94-96, 1992.
- Leone, F.A.; Baranauskas, J.A.; Furriel, R.P.M.; Borin, I.A. SIGRAFW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.
- Lima, V.M.G.; Krieger, N.; Sarquis, M.I.M.; Mitchell, D.A.; Ramos, L.P.; Fontana, J.D. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 41, n. 2, p. 105-110, 2003.
- Lima, V.M.G. **Produção e purificação da lipase de *Bacillus megaterium***. Tese apresentada à Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica. 2004.
- Lineweaver, H; Burk, D. The Determination of enzyme dissociation constants. **J. Am. Chem. Soc.**, v.56, p. 658-666, 1934.
- López, N.; Pernas, M. A.; Pastrana, L. M.; Sánchez, A.; Valero, F.; Rúa, M. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, p. 65-73, 2004.
- Louwrier, A.; Drtina, G.J.; Klivanov, A.M. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 50, n. 1, p. 1-5, 1996.
- Lowry, H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A. L.; Randal, R.J. Protein measurement with the Folin phenol regente. **J. Biol. Chem.**, v.193, p267-275, 1951.
- Mahadik, N.D.; Puntambekar, U.S.; Bastawde K.B.; Khire, J.M.; Gokhale D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochem.**, v. 38, p. 715-721, 2002.

- Maia, M.M.D.; Morais, M.M.C.; Morais Jr., M.A.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *fusarium solani*. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 304-309, 1999.
- Mala, J. G. S.; Edwinliver, N.G.; Kamini, N.R.; Puvanakrishnan, R. Mixed substrate solid state fermentation for production and extraction of lipase from *Aspergillus niger* MTCC 2594. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 53, p.247-253, 2007.
- Martinelle, M.; Hult, K. Kinetics of triglyceride lipases. In: Lipases, their structure, biochemistry and applications, pp. 159 - 180. Wooley, P.; Petersen, S.B. (Eds.) U. K.: **Cambridge University Press**, 1994.
- Matsumoto, T.; Takahashi, S.; Kaieda, M.; Ueda, M. Tanaka, A.; Fukuda, H.; Kono, A. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p. 515-520, 2001.
- McIlvaine, T.C. A buffer solution for colorimetric comparison. **J. Biol. Chem.**, v. 49 (1), p. 183-186, 1921.
- Messias, J.M.; Costa, B.Z.; Lima, V.M.G.; Dekker, R.F.H.; Rezende, M.I.; Krieger, N.; Barbosa, A.M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 45, p. 426-431, 2009.
- Michelin, M. Potencial do fungos *Aspergillus terricola* e *Aspergillus ochraceus* no desenvolvimento de bioprocessos e propriedades das enzimas xilanolíticas. Ribeirão Preto, 2009. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Miled, N.; Bussetta, C.; De Caro, A.; Riviere, M.; Berti, L.; Canaan, S. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases **Comp. Biochem. Physiol., Part B**, v. 136, p. 131-38, 2003.
- Mitchell, D. A.; Krieger, N.; Stuart, D. M.; Pandey, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.
- Mustafa, U.; Kaur, G. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. **Int. J. Biotechnol. Biochem.**, v. 6, n. 5, p. 701-713, 2010.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger. Princípios de bioquímica. Quarta edição. **Sarvier editora**. 2006.

- Ninet, B.; Jan, I.; Bontems, O.; Léchenne, B.; Jousson, O.; Panizzon, R.; Lew, D.; Monod, M. "Identification of dermatophyte species by 28S Ribosomal DNA sequencing a commercial kit". **J. Clin. Microbiol.**, v. 41 (2), p. 826-830, 2003.
- Nini, L.; Sarda, L.; Louis-Claude, C.; Boitard, E.; Jean-Paul, D.; Chahinian, H. Lipase catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a Kinetic study. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1534, p. 34-44, 2001.
- Nury, S.; Gaudry-Rolland, N.; Rivière, C.; Gargouri, Y.; Bois, A.; Lin, M.; Grimaldi, M.; Richou, J.; Verger, R. Lipase kinetics at the triacylglycerol-water interface. In: *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*, p.123-127. Alberghina, L.; Schmid, R.D.; Verger, R. (Eds.). Weinheim: **GBF Monographs**, vol. 16, 1991.
- Pandey, A; Benjamin, S; Soccol, C.R.; Nigam, P; Krieger, N.; Soccol, V.T. The realm of microbial lipases in biotechnology. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 29, p 119-131, 1999.
- Pandey, A.; Soccol, C. R.; Mitchell, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.
- Pandey, A. Solid-state fermentation. **Biochem. Eng. J.**, v. 3636, p. 1-4, 2002.
- Parawira, W. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 29, n. 2, p. 82-93, 2009.
- Park, D.S.; Oh, H.W.; Heo, S.Y.; Jeong, W.J.; Shin, D.H.; Bae, K.S.; Park, H.Y. Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a Longicorn Beetle. **J. Microbiol.**, v. 45, p. 409-417, 2007.
- Pencreac'h, G.; Baratti, J.C. Activity of *Pseudomonas cepacia* lipase in organic media is greatly enhanced after immobilization on a polypropylene support. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 630-635, 1997.
- Pencreac'h, G.; Baratti, J.C. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in n-heptane by *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 18, p 417-22, 1996.

- Peixoto, S.C. **Estudos comparativos entre amilases produzidas em cultivo submerso e em substrato sólido pelo fungo termotolerante *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis***. Purificação e caracterização enzimática. Ribeirão Preto, 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Peixoto-Nogueira, S.C. ; Sandrim, V. C. ; Jorge, J. A. ; Terenzi, H. F. ; Polizeli, M. L. T. M. . Evidence of thermostable amylolytic activity from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* using wheat bran and corncob as alternative carbon source. **Bioprocess Biosyst. Eng.** v. 31, p. 329-340, 2008.
- Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. Microbiologia conceitos e aplicações. São Paulo. **Pearson Makron Books**. Segunda edição, v. 1, 524 p., 1996.
- Peralta, R.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. “ β -D-Glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme”. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1033, p. 243-249, 1990.
- Pinna, M. C.; Salis, A.; Monduzzi, M.; Ninham, B. W. Hofmeister series: the hydrolytic activity of *Aspergillus niger* lipase depends on specific anion effects. **J. Phys. Chem. B**, v. 109,p; 5406-5408 , 2005.
- Polizeli, M.L.T.M.; Rizzatti, A.C.S.; Monti, R.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A.; Amorim, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. Review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 67, p. 577-591, 2005.
- Polizeli, M.L.T.M. Properties and Commercial Applications of Xylanases from Fungi. In: Rai, M. (Ed.). Fungal Biotechnology. New Delhi: **I.K. International**, 2009. 507 p.
- Polizelli, P.P. **Caracterização bioquímica de lipase extraída de sementes de *Pachira aquática***. São José do Rio Preto, 2008, 126 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – UNESP.
- Polizelli, P.P.; Facchini, F.D.A.; Cabral, H.; Bonilla-Rodriguez, G.O. A New Lipase Isolated from Oleaginous Seeds from *Pachira aquatic* (Bombacaceae). **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p. 233-242, 2008.
- Pottevin, H. Actions diastasiques réversibles. Fornation et dédoublement des ethers-sels sous l’influence des diastases du pancréas. **Annales de l’Institut Pasteur**, v. 20, p. 901-923, 1906.

- Pouderoyen, G. van; Eggert, T.; Jaeger, K.E.; Dijkstra, B.W. The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hydrolase fold enzyme. **J. Mol. Biol.**, v. 309, p. 215-226, 2001.
- Rahman, R.N.Z.R.A.; Baharum, S.N.; Salleh, A.B.; Basri, M. S5 Lipase: An organic solvent tolerant enzyme. **J. Microbiol.**, v. 44, n. 6, p. 583-590, 2006.
- Rehner, S.A.; Buckley, E. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 84-98, 2005.
- Rizzatti, A.C.S.; Jorge, J. A.; Terenzi, H.F.; Rechia, C.G.V.; Polizeli, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular-D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.26, p. 96-100 156-160, 2001.
- Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Uma estratégia sequencial de planejamentos. **Casa do Pão Editora**, 2005.
- Rodriguez Couto, S.; Sanromán, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochem. Eng. J.**, v. 22, p. 211-219, 2005.
- Sá-Pereira, P.; Duarte, J.C.; Ferrara, M.A.; Lacerda, P.S.B.; Alves, F.C. Biocatálise: Estratégias de inovação e criação de mercados In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.; Corvo, M.L.; Vermelho, A.B.; Paiva, C.L.A.; Alencastro, R. B.; Coelho, R.R.R. (Ed.) Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: **Editora Interciência**, 2008. 506 p.
- Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Enzimas como agente Biotecnológico. 1. ed. **Editora Legis Summa**, 2004.
- Saisubramanian, N.; Sivasubramanian, S.; Nandakumar, N.; Indirakumar, B.; Chaudhary, N.A.; Puvanakrishnan. Two step purification of *Acinetobacter* sp. lipase and its evaluation as a detergent additive at low temperatures. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p. 139-156, 2008.
- Santos, A. S. R. Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida. Revista Informação e Tecnologia, Campinas, 2002. Disponível em: <http://www.ccuec.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>. Consultado em 28/02/2010.
- Sarda, L.; Desnuelle, P. Action de la lipase pancréatique sur les ésteres en emulsion. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 30, p. 513 - 521, 1958.

- Sasaki, F.; Miyamoto, T.; Tamai, Y.; Yajima, T. Note on *Cordyceps brongniartii* Shimazu collected from the wild in Japan. **Mycoscience**, v. 48, p. 312-315, 2007.
- Saxena, R.K.; Sheoran, A.; Giri, B.; Davidson, W.S. Purification strategies for microbial lipases. **J. Microbiol. Methods**, v.52, p. 1-18, 2003.
- Schrag, J.D.; Cygler, M. Lipases and alpha/beta hydrolase fold. Methods. **Enzymol.**, v. 284, p. 85-107, 1997.
- Schønheyder, F.; Volqvartz, K. On the affinity of pig pancreas lipase for tricaproin in heterogeneous solution. **Acta Physiol. Scand.**, v. 9, p. 57-67, 1945.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnol. Adv.**, v.19, p.627-662, 2001.
- Sharma, M.; Chadha, B.S; Kaur, M.; Ghatora, S.K.; Saini, H.S. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, p. 526-535, 2008.
- Shu, Z.Y.; Yang, J.K.; Yan, Y.J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chin. J. Biotech.**, v. 23, p. 96-100, 2007.
- Silva, D.; Martins, E.S.; Da Silva, R.; Gomes, E. Pectinase production by *Penicillium viridicatum* RFC3 by solid state fermentation using agricultural wastes and agro-industrial by-products. **Braz. J. Microbiol**, v. 33, p. 318-324, 2002.
- Silva, T.M. **Produção e determinação das propriedades funcionais das amilases de *Aspergillus niveus***. Ribeirão Preto, 2009. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Biologia Comparada) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.
- Silva, W.O.B.; Mitidieri, S.; Schrank, A.; Vainstein, M.H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochem.**, v. 40, p. 321-326, 2005.
- Silveira, V.D. Micologia. Quinta edição. Rio de Janeiro: **Âmbito Cultural Edições LTDA**. 332 p., 1995.
- Sun, S.Y.; Xu, Y. Solid-state fermentation for ‘whole cell synthetic lipase’ production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. **Process Biochem.**, v. 43, p. 219-224, 2008.

- Supakdamrongkul, P.; Bhumiratana, A.; Wiwat, C. Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomurae riley* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. **J. Invertebr. Pathol.**, 2010, no prelo.
- Sztajer, H.; Maliszewska, I.; Wieczorek, J. Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme Microb. Technol.**, v.10, p.492–497, 1988.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- Tombs, M.P.; Blake, G.G.. Stability and inhibition of *Aspergillus* and *Rhizopus* lipases. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 700, p.81-89, 1982.
- Trevisan, H.C. Lipases. In: Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Enzimas como agente Biotecnológico. 1. ed. Ribeirão Preto: **Editora Legis Summa**, p. 115-135, 2004.
- Vargas, G.D.L.P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. Erechim, Rio Grande do Sul, 2004, 98 p. (Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim).
- Verger, R.; De Haas, G.H. Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. **Ann. Rev. Biophys. Bioeng.**, v. 5, p. 77-117, 1976
- Verger, R.; Mieras, M.C.E.; Haas, G.H. Action of phospholipase A at interfaces. **J. Biol. Chem.**, v.248, p. 4023, 1973.
- Vogel, H.F. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. **Am. Nat.**, v. 98, p. 435-446, 1964.
- Wang, I.F.; Lalonde, J.J.; Momogan, M.; Bergbreiter, D.E.; Wong, C.H. Lipase catalysed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective synthesis of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 110, p. 7200-7205, 1988.
- Wang, D.L.; Nag, A.; Lee, G.C.; Shaw, J.F. Factors affecting the resolution of *dl*-menthol by immobilized lipase-catalyzed sterification in organic solvent. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 262-265, 2002.

- Wang, Y.; Scrivastava, K.; Shen, G.J.; Wang, H.Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* strain A30-1 (ATCC 538410). **J. Ferment. Bioeng.**, v.79 (5), p. 433-438, 1995.
- Wubbolts, M.G.; Bucke, C.; Bieleki, S. How to get the biocatalyst. In: Straathof, A.J.J, Adlercreutz. P. (Ed). Applied Biocatalysis. Amsterdam: **Academic Publishers**, 2000, p. 153-211.
- Yang, X.; Chen, H.; Gao, H.; Li, Z. Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. **Bioresour. Technol.**, v.78, p.277-280, 2001
- Zalacain, I.; Zapelena, M.J.; Astiasaran, I.; Bello, J. Dry fermented sausages elaborated with lipase from *Candida cylindracea*. Comparison with traditional formulations. **Met. Sci.**, v. 40, p. 55-61, 1995.
- Zheng-Yu, S.; Jiang-Ke, Y.; Yun-Jun, Y. Purification and characterization of lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chin. J. Biotechnol.**, v.23, n .1, p. 96-100, 2007.
- <http://www.amano-enzyme.co.jp/>. Consultado em 13/02/2010
- <http://www.biodiesel.org.br>. Consultado em 28/02/2010.
- <http://www.led.uni-stuttgart.de/>
- <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>. Consultado em 20/03/2008.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

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](#)