

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MONOACIL-
GLICÉROL LIPASE MICROBIANA E APLICAÇÃO DE LIPASES
NA HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

16/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MONOACIL-
GLICEROL LIPASE MICROBIANA E APLICAÇÃO DE LIPASES
NA HIDRÓLISE E ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Parcial

Este exemplar corresponde
a versão final da tese
defendida por Glaucia Ma-
ria Pastore e aprovada
pela comissão julgadora
em 09.06.92.

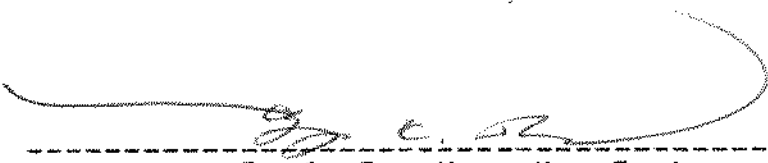
Glaucia Maria, Pastore 2/3/92

Prof. Dr. Yong Kun, Park
Orientador

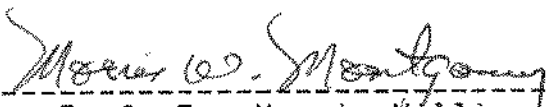
Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências de Alimentos.

1992

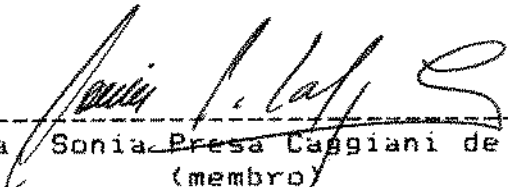
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)



Prof. Dr. Morris William Montgomery
(membro)



Profa. Dra. Sonia Presa Caggiani de Salzberg
(membro)



Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes
(membro)



Prof. Dr. Manoel Francisco Guimarães
(membro)



Prof. Dr. João Shogiro Tango
(membro)



Prof. Dr. José Luiz Pereira
(membro)

Campinas, 09 de junho de 1992.

À Deus Pai Todo Poderoso

que tem me dado espírito de luta,
coragem e alegria para o continuar
da caminhada....

Aos meus Pais,

Pelo amor e constante apoio

Aos meus irmãos e sobrinhos

Pelo carinho e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela sua constante e valiosa orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade e pelo exemplo dignificante de Professor e Cientista.

À Profa. Hélia Harumi Sato pelo auxílio e apoio em todos os momentos, cujo coleguismo e amizade tem tornado em todos estes anos o trabalho profícuo e o fardo leve.

À Maria Das Dores Oliveira pela amizade, dedicação e espírito de colaboração para quem as palavras de agradecimento sempre ficaram aquém de seu verdadeiro significado.

Aos Professores Adilma R. P. Scamparini, Délia Rodriguez Amaya, José Luiz Pereira, Sonia Presa de Salzberg pela amizade, compreensão e estímulo.

À Profa. Débora de Queiróz Tavares pelas eletromicrografias utilizadas na identificação do microrganismo e pelo apoio e incentivo constantes.

À Cícera, Jardeite, Franceli da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos pela gentileza e constante atenção.

Aos Marcos Antonio de Castro e Marcos Sampaio Silveira pela confecção deste trabalho, incansáveis no desejo de produzir o melhor.

À Telma Sílvia T.A. Sallum da Secretaria de Pós-Graduação da FEA pela atenção e gentileza.

Aos Funcionários da Biblioteca da FEA, em especial a Dona Angelina pelo auxílio e atenção.

À Marta Mitsui de Almeida pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Lúcio pela confecção das figuras e Salete pela atenção e amizade.

À Esmeralda Z. Borghi pela confecção dos desenhos.

À Iara Honório do Laboratório de Nutrição da FEA-UNICAMP pela inestimável contribuição e atenção.

Aos amigos do Departamento de Ciência de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação) pela edição deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
SUMMARY.....	xv
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	85
3.1. Materiais.....	85
3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos.....	85
3.1.2. Equipamentos.....	87

3.2. Métodos.....	88.
3.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas lipolíticas.....	88
3.2.1.1. Coleta de amostras.....	88
3.2.1.2. Isolamento de fungos.....	88
3.2.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas lipolíticas.....	89
3.2.1.4. Determinação da atividade de lipase.....	89
3.2.1.4.1. Determinação da atividade de lipase.....	89
3.2.1.4.2. Determinação da atividade de lipase com substrato monoleína comercial.....	90
3.2.1.4.3. Determinação da atividade de lipase com substrato sintético p-nitrofenillaurato.....	92
3.2.1.5. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise de lipídeo por ação da lipase.....	92
3.2.1.6. Purificação de glicerídeos em coluna de alumina neutra.....	94
3.2.1.7. Cromatografia líquida de alta pressão dos produtos de hidrólise de glicerídeos pela lipase.....	94
3.2.1.8. Identificação e conservação da linhagem produtora de lipase.....	95
3.2.3. Produção de lipase pela linhagem de <u>Trichoderma sp.</u>	95
3.2.3.1. Produção de lipase por fermentação semi-sólida pela linhagem de <u>Trichoderma sp.</u>	96
3.2.3.2. Produção de lipase por fermentação líquida pelo microrganismo <u>Trichoderma sp.</u>	96
3.2.4. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura e Produção da Enzima a 30oC.....	97
3.2.5. Produção e purificação da lipase.....	97
3.2.5.1. Produção de lipase.....	97

3.2.5.2. Purificação da lipase.....	98
3.2.5.2.1. Fracionamento da lipase com sulfato de amônio.....	98
3.2.5.2.2. Cromatografia da lipase em coluna de dietilaminoetil-celulose (DEAE-celulose).....	98
3.2.5.2.3. Cromatografia da lipase em coluna carboximetil-celulose (CM-celulose).....	99
 3.2.6. <u>Caracterização da lipase bruta e purificada</u>	100
3.2.6.1. Influência do pH na atividade enzimática.....	100
3.2.6.2. Influência do pH na estabilidade da enzima....	101
3.2.6.3. Influência da temperatura na atividade enzimática.....	102
3.2.6.4. Estabilidade térmica da lipase.....	102
3.2.6.5. Influência de sais minerais e outros compostos na atividade enzimática.....	103
3.2.6.6. Influência de inibidores na atividade enzimática.....	104
3.2.6.7. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática.....	104
 3.2.7. Hidrólise de glicerídeos pela lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	105
 3.2.8. Determinação do número de saponificação.....	106
 3.2.9. Determinação de carboidratos totais presentes na lipase purificada.....	107
 3.2.10. Estudo da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases microbianas combinadas.....	107
3.2.10.1. Determinação da atividade das lipases comerciais.....	107
3.2.10.2. Influência da concentração das lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva.....	108
3.2.10.3. Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas.....	108

3.2.10.4.	Influência da concentração de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases.....	109
3.2.10.5.	Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas com teor de tampão reduzido no sistema de reação.....	110
3.2.10.6.	Influência da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de <u>Candida rugosa</u>	111
3.2.10.7.	Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva.....	111
3.2.10.8.	Influência da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva.....	112
3.2.11.	Estudo da produção de monoglicerídeo através da esterificação de ácido graxo e glicerol por lipase microbiana comercial.....	113
3.2.11.1.	Seleção da enzima para reação de esterificação.....	114
3.2.11.2.	Influência da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática.....	114
3.2.11.3.	Influência da concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol sobre o grau de esterificação enzimática.....	115
3.2.11.4.	Influência da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol no grau de esterificação enzimática.....	116
4-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
4.1.	Isolamento e Seleção de Microrganismos.....	117

4.1.1. Seleção preliminar de microrganismos produtores de lipase.....	117
4.1.2. Seleção do microrganismo melhor produtor de lipase.....	121
4.2. Identificação da Linhagem Produtora de Lipase....	121
4.3. Produção de Lipase pela Linhagem de <u>Trichoderma</u> <u>sp.</u>	124
4.4. Produção e Purificação de Lipase.....	128
4.5. Caracterização da Lipase Bruta e Purificada.....	130
4.5.1. Efeito do pH na atividade enzimática.....	130
4.5.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima.....	134
4.5.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática..	139
4.5.4. Estabilidade térmica da enzima.....	141
4.5.5. Efeito de sais minerais e outros compostos na atividade enzimática.....	143
4.5.6. Efeito de inibidores na atividade enzimática...	148
4.5.7. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática.....	150
4.5.8. Hidrólise de glicerídeos pela lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	154

4.5.9. Determinação de carboidratos totais presentes na lipase purificada.....	162
4.6. Estudo da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases microbianas combinadas.....	163
4.6.1. Efeito da concentração das lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva.....	163
4.6.2. Hidrólise de óleo de oliva por sistemas de lipases combinadas.....	165
4.6.3. Efeito da quantidade de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases.....	169
4.6.4. Hidrólise de óleo de oliva por um sistema de lipases combinadas com quantidade de tampão reduzida no sistema de reação.....	169
4.6.5. Efeito da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de <u>Candida rugosa</u>	172
4.6.6. Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	172
4.6.7. Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzima e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	177
4.7. Estudo da Produção de Monoglicerídeo Através da Reação de Esterificação de Ácido Graxo e Glicerol por Lipase de <u>Penicillium sp</u>	185
4.7.1. Efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática...	185

4.7.2. Efeito da concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol sobre o grau de esterificação enzimática.....	191
4.7.3. Efeito da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol no grau de esterificação enzimática.....	200
5- CONCLUSÕES.....	204
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	207

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Seleção de microrganismos melhores produtores de lipase.....	118
Tabela 2 - Purificação da lipase extracelular de <u>Trichoderma sp.</u>	133
Tabela 3 - Lipases microbianas.....	136
Tabela 4 - Efeito de sais minerais na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenil-laurato.....	145
Tabela 5 - Efeito de alguns compostos na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenil-laurato.....	147
Tabela 6 - Efeito de inibidores de enzimas na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenil-laurato.....	149
Tabela 7 - Porcentagem de hidrólise de glicerídeos pela lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	155
Tabela 8 - Hidrólise de glicerídeos pela lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	156
Tabela 9 - Efeito da concentração de lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva.....	164
Tabela 10 - Porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por Sistema de Lipases Combinadas.....	166
Tabela 11 - Efeito da quantidade de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases.....	170
Tabela 12 - Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas com teor de tampão reduzido no sistema de reação.....	171
Tabela 13 - Efeito da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de <u>Candida rugosa</u>	173

Tabela 14 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	174
Tabela 15 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	175
Tabela 16 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	176
Tabela 17 - Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	178
Tabela 18 - Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.....	179
Tabela 19 - Seleção de lipase comercial para esterificação de ácido graxo e glicerol.....	186
Tabela 20 - Composição dos glicerídeos formados na reação de esterificação entre glicerol e ácido oleico por lipase de <u>Penicillium sp.</u>	192
Tabela 21 - Efeito da concentração de glicerol em relação a concentração de ácido oleico sobre o grau de esterificação enzimática.....	193
Tabela 22 - Efeito da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de 3,8 moles de glicerol na esterificação enzimática (expresso em porcentagem de esterificação).....	202

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Representação Esquemática da Ação de Enzimas Lipolíticas.....	119
FIGURA 2 - Sequência de Reações das Lipases na Hidrólise de óleos e Gorduras.....	120
FIGURA 3 - Eletromicrografia de <u>Trichoderma sp.</u>	122
FIGURA 4 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação e Produção de Lipases pela linhagem de <u>Trichoderma sp.</u> Nº 817.....	126
FIGURA 5 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação e Produção de Lipases pela linhagem de <u>Geotrichum candidum</u>	127
FIGURA 6 - Fluxograma de Produção e Purificação de Lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	129
FIGURA 7 - Cromatografia de Lipase em Coluna de DEAE-celulose.....	131
FIGURA 8 - Cromatografia de Lipase em Coluna de CM-celulose.....	132
FIGURA 9 - Efeito do pH na Atividade de Lipase Bruta e Purificada.....	135
FIGURA 10A - Efeito do pH na Estabilidade de Lipase Bruta e Purificada.....	137
FIGURA 10B - Efeito do pH na Estabilidade de Lipase Bruta e Purificada.....	138
FIGURA 11 - Efeito da Temperatura na Atividade de Lipase Bruta e Purificada.....	140
FIGURA 12 - Estabilidade Térmica da Lipase Bruta e Purificada.....	142
FIGURA 13 - Efeito da Concentração do Substrato 1(3)-Monoleína na Atividade de Lipase.....	151
FIGURA 14 - Efeito da Concentração do Substrato 1,2(1,3)-Dioleína na Atividade de Lipase.....	152

FIGURA 15	- Efeito da Concentração do Substrato Paranitrofenillaurato na Atividade de Lipase...	153
FIGURA 16A	- Porcentagem de Hidrólise dos Substratos 1(3)-Monoleína, 1(3)-Monolaurato e óleo de Oliva pela Lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	158
FIGURA 16B	- Hidrólise de Monoleína e Trioleína pela Lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	159
FIGURA 17	- Hidrólise de Monoleína Comercial por Lipase de <u>Trichoderma sp.</u>	160
FIGURA 18	- Atuação da Lipase de <u>Trichoderma sp.</u> nos Substratos Trioleína, Dioleína e Monoleína após 20 horas de Reação.....	161
FIGURA 19	- Porcentagem de Hidrólise de óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas em Relação ao Tempo de Incubação.....	167
FIGURA 20	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas $\text{Ca}_{12}\text{E} + \text{G}_2$, após 2 horas de Reação.....	180
FIGURA 21	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas $\text{Ca}_{12}\text{E} + \text{G}_2$, após 20 horas de Reação.....	181
FIGURA 22	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas $\text{Ca}_{12}\text{E} + \text{N}_2$, após 2 horas de Reação.....	183
FIGURA 23	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas $\text{Ca}_{12}\text{E} + \text{N}_2$, após 20 horas de Reação.....	184
FIGURA 24	- Efeito da Proporção entre Glicerol e Ácido Oleico no Grau de Esterificação Enzimática.....	187
FIGURA 25A	- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 1:1, por Lipase de <u>Penicillium sp.</u>	188
FIGURA 25B	- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 2:1, por Lipase de <u>Penicillium sp.</u>	189

FIGURA 25C - Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 3:1, por Lipase de <u>Penicillium sp.</u>	190
FIGURA 26 - Efeito da Proporção entre Glicerol e Ácido Oleico sobre o Grau de Esterificação Enzimática após 64 horas de Reação	194
FIGURA 27A - Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,94:0,12	195
FIGURA 27B - Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,06:1,0	196
FIGURA 27C - Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 2,0:2,0	197
FIGURA 27D - Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,8:0,26	198
FIGURA 27E - Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,47:0,5	199
FIGURA 28 - Efeito da Variação na Concentração Molar de Ácido Oleico na No Sistema de Reação sobre o Grau de Esterificação Enzimática por Lipase de <u>Penicillium sp.</u>	201
FIGURA 29 - Curva Padrão da Concentração de Ácido Oleico x Volume de KOH 0,1N	91
FIGURA 30 - Curva Padrão de Solução de Paranitrofenol x Absorbância a 410 nm	93

RESUMO

Um mil duzentas e oitenta e cinco linhagens de microrganismos foram isoladas de amostras de solo, frutas, resíduos industriais e testados quanto à capacidade de hidrolisar glicerídeos.

Oito linhagens de Fungos foram relacionadas preliminarmente como produtoras de enzimas lipolíticas. Entre estas, uma linhagem identificada como Trichoderma sp apresentou alta produção de lipase.

A enzima lipolítica de Trichoderma sp hidrolizou as ligações éster de monoleína, dioleína e do substrato paranitrofenillaurato. A enzima pode ser classificada como uma lipase (glicerol-mono éster hidrolase E.C. 3.1.1.23).

Estudou-se a produção de lipase extracelular pela linhagem selecionada de Trichoderma sp e a enzima foi purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose. A enzima purificada foi caracterizada e apresentou atividade ótima em pH 5,6 a 40 - 45°C. A atividade enzimática foi severamente afetada pela presença de $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, na concentração de 1 mM de sal em relação ao volume final da mistura de reação, enquanto que KCl , $CaCl_2$, $NiSO_4$ inibiram moderadamente a atividade de lipase.

O reagente cisteína na concentração de 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação inibiu significativamente a atividade enzimática.

Verificou-se que a lipase de Trichoderma sp hidrolisa eficientemente monoleína e paranitrofenillaurato. A enzima não tem afinidade por trioleína.

A hidrólise de óleo de oliva por via enzimática foi estudada utilizando-se lipases combinadas. Foi verificado que o sistema composto de lipase de Candida rugosa e lipase de Penicillium sp. hidrolisou 95,9% do óleo com o tempo de reação de 20 horas.

A esterificação enzimática de ácido graxo e glicerol por lipase de Penicillium sp. foi examinada e verificou-se que a enzima esterificou cerca de 71% de monoglicerídeo após 40 horas de reação.

SUMMARY

The screening of lipase producing microorganisms was performed using 1,285 strains of microorganism which were isolated from samples of soil, fruits, and industrial residues. It was found that eight strains of fungi produced high activity of extracellular lipase and one of them produced exceptionally high lipase activity. This strains was identified as Trichoderma sp., and the lipase from the strain hydrolised only monoolein, diolein and p-nitrophenyl laurate. For this reason, the lipase was classified as monoglyceride lipase (monoacylglycerol lipase E.C. 3.1.1.23).

The lipase from Trichoderma sp., was produced by solid state fermentation and submerge fermentation. The enzyme extracts were purified by fractionation with ammonium sulfate, DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatography. The purified enzyme was characterized and found that optimum pH and temperature were 5.6, and 40-45°C. $MgSO_4$, $MnSO_4$ and $FeSO_4$, 1 mM, markably inhibited enzyme activity and KCl, $CaCl_2$ and $NiSO_4$, 1 mM, slightly inhibited. Cysteine, 1 mM significantly inhibited the enzyme activity. The enzyme also efficiently hydrolised monoolein and p-nitrophenyl laurate but not triolein.

It was studied a combined enzyme system, which was a mixture of triacylglycerol lipase (from Candida rugosa) and monoacylglycerol lipase (from Penicillium sp.), for hydrolyses of olive oil. It was found that the combined enzyme system was able to hydrolyse 95.9% the oil, when the reaction time was 20 hours.

Enzymatic esterification using glycerol and fatty acid by lipase from Penicillium sp. was also examined. It was found that the reaction system esterified 71% monoglyceride after 40 hours of reaction time.

1- INTRODUÇÃO

Enzimas lipolíticas como lipases e esterases constituem um importante grupo de enzimas associadas com o metabolismo e com a degradação de lipídeos. São largamente distribuídas na natureza estando presentes em tecidos e fluídos de origem animal e vegetal e em microrganismos.

As lipases são fisiologicamente importantes pois hidrolisam óleos e gorduras fornecendo ácidos graxos livres e glicerídeos que são essenciais para o processo metabólico.

Paralelamente estas enzimas são de grande importância na indústria de alimentos podendo conferir qualidades ou defeitos ao produto final. Assim lipases podem hidrolisar lipídeos e produzir odor indesejável de ranço em produtos laticínios, carne, peixe e outros produtos que contêm gordura.

Por outro lado, elas são indispensáveis para o desenvolvimento de sabor e odor específicos e característicos de alguns alimentos. Por exemplo, lipases são necessárias para o desenvolvimento de aroma e sabor típico dos queijos Roqueforti, Camemberti e outros.

Do ponto de vista bioquímico o mais importante aspecto das enzimas lipolíticas é o seu caráter único nas reações que realizam, pois sendo, enquanto enzimas, solúveis em água, atuam em substratos não solúveis em água, ocorrendo a reação enzimática na interface óleo/água.

As enzimas lipolíticas também realizam a reação inversa da hidrólise, esterificando glicerol e ácidos graxos, podendo produzir glicerídeos desejados desde que o meio tenha concentração restrita de água.

As lipases são hidrolases cuja classificação depende do tipo de substrato no qual elas atuam. De forma geral todas as enzimas lipolíticas agem sobre ésteres de glicerol.

O presente trabalho visa o isolamento e seleção de microrganismo produtor de enzima lipolítica que hidrolise as ligações éster de glicerídeo.

O microrganismo produtor de lipase com maior atividade será utilizado na produção da enzima.

A preparação bruta de lipase extracelular de Trichoderma sp. Nº 817 será submetida a purificação através do fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose e será caracterizada quanto às suas propriedades bioquímicas.

Serão estudados sistemas de lipases combinadas com especificidades diferentes para otimizar o grau de hidrólise de óleos e gorduras para produção de ácidos graxos e glicerídeos.

As condições para a produção de monoleína através de esterificação enzimática serão estudadas utilizando-se lipase comercial de Penicillium sp.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BALLS & MATLACK em 1938 (11) estudaram o modo de ação da lipase pancreática. Foi verificado o efeito da lipase pancreática numa série de monoésteres. A taxa de hidrólise exibiu a mesma variação característica de acordo com o comprimento da cadeia de ácido graxo. Evidências levaram à conclusão que somente éster primário é hidrolisado por esta lipase. A ocorrência de hidrólise enzimática na posição 2 deve ser acompanhada de migração do grupo 2 para a posição 1 do triglicerídeo.

SHIPE em 1950 (213) verificou a especificidade relativa de lipases produzidas por Penicillium roqueforti e Aspergillus niger. Estas lipases foram estudadas por terem demonstrado marcada diferença na sua especificidade. As enzimas foram produzidas em meio de cultura sem óleo ou gordura para não estimular a produção de lipases com especificidade pré-determinada. Para produção de lipase de Penicillium foi utilizado o meio composto de peptona, extrato de carne e glucose (pH 7,0), para produção de lipase de Aspergillus foi acrescentado ao meio para Penicillium tampão citrato-fosfato pH 5,0. As lipases estudadas apresentaram diferença sensível na taxa de hidrólise dos substratos tributirina, tricaprílina e trioleína. A lipase de Aspergillus niger hidrolisa mais eficientemente em ordem decrescente tricaprílina, trioleína e tributirina. A lipase de Penicillium roqueforti hidrolisa mais

eficientemente em ordem decrescente tributirina, tricaprilina e trioleína. O pH ótimo das enzimas foi verificado ser 5,0 a 5,5 e a temperatura ótima de 30 a 35°C para lipase de Penicillium e entre 35 e 40°C para a lipase de Aspergillus, sendo que a adição de cloreto de cálcio demonstrou acelerar a ação de ambas lipases.

MORRIS & JEZESKI em 1953 (152) identificaram algumas características do sistema de lipases de Penicillium roqueforti, utilizando uma cultura pura do microrganismo inoculada em meio de cultura Czapek ao qual foi adicionado 3 g de peptona e 3 g de gordura de manteiga por litro. Para a emulsificação da gordura foi utilizado 0,5% de goma acácia. A temperatura ótima de hidrólise de tributirina e gordura de leite esteve compreendida entre 30 e 32°C, o pH ótimo de atividade variava de acordo com o tipo de preparação da enzima. Quando foi utilizado o filtrado do meio de cultura, o pH ótimo para hidrólise de tributirina foi 7,0 e 7,8 e 6,5 a 6,8 para gordura de leite. Quando foi utilizada preparação micelial do Penicillium roqueforti o pH ótimo para hidrólise da tributirina foi 6,0 a 6,7 e 7,0 a 7,2 para gordura de leite. As enzimas lipolíticas presentes nestas duas preparações demonstraram maior especificidade relativa para triglicerídeos que para ésteres de etila. Havia uma taxa de hidrólise consistentemente mais elevada quando o sistema enzimático agia sobre a tributirina do que sobre outro substrato utilizado. O sistema de lipases deste microrganismo apresentou um terço da atividade

em gordura de leite quando comparado com a atividade apresentada com tribulirina. As diferenças nas características das duas preparações enzimáticas (micelial e filtrado do meio de cultura) constituem confirmação adicional que poderia haver mais de um tipo de lipase produzida por este fungo.

HARPER & GOULD em 1955 (51) demonstraram as características gerais do sistema de lipases usado na obtenção de queijos Provolone e Romano. Tradicionalmente, tais queijos são preparados com pastas de renina bruta. A lipase fornecida neste material promoverá o desenvolvimento do sabor característico destes queijos, pela liberação de ácido butírico resultante da ação enzimática, sobre a gordura de leite. A temperatura ótima para lipólise foi entre 29 e 35°C, para as várias preparações estudadas. Em relação à origem da pasta de renina, foi verificado que a pasta de renina de bezerro apresenta três lipases com pH ótimo de 8,6; 6,2 e uma entre 5,0 e 6,0. A preparação obtida de carneiro exibiu duas lipases com pH ótimo de 5,9 e 6,6.

MATTSON & BECK em 1955 (141) estudaram a digestão "in vitro" de triglicerídeos por lipase pancreática. Foi utilizado óleo de algodão como substrato, e temperatura de 40°C para hidrólise, observando-se que a adição de sal biliar demonstrou ter pouco efeito na taxa de hidrólise. Foram encontrados quantidades apreciáveis de 2-monoglicerídeo e 1-monoglicerídeo, quando o tempo de reação foi inferior a 60 minutos. Após este tempo foi encontrado apenas uma mistura em equilíbrio de 1(2)-

monoglicerídeo. Quando foi utilizado 2-oleil palmitina como substrato, foi formado oleil palmitina e monoleína como diglicerídeo e monoglicerídeo respectivamente. Estes resultados indicaram que o curso da hidrólise de triglicerídeos "in vitro" parece ser o mesmo que "in vivo", ou seja, uma série de reações sequenciais que transformam os triglicerídeos em 1,2-diglicerídeos e estes para 2-monoglicerídeos. O 1-monoglicerídeo é o resultado da isomerização do 2-monoglicerídeo. A hidrólise de triglicerídeo para diglicerídeo foi verificada ser de primeira ordem, a conversão de diglicerídeo para monoglicerídeo é de ordem zero. A hidrólise de monoglicerídeo para glicerol procedeu tão lentamente que foi impossível caracterizar esta reação. Estes resultados sugeriram que lipase pancreática é específica para hidrólise de ésteres primários.

HARPER & LONG em 1956 (53) estudando a maturação de queijos tipo Provolone observaram que o conteúdo de ácidos graxos e aminoácidos livres em queijos de mesma idade variavam muito. O teor de ácidos graxos livres variava de acordo com o tipo de enzima usada em sua manufatura, enquanto o conteúdo de aminoácidos livres estava relacionado ao tipo de organismo utilizado como "starter". Foi observado a existência de uma interrelação entre a concentração de ácido butírico livre e ácido glutâmico livre e intensidade de sabor, sendo que a proporção de 1:2 de ácido butírico para ácido glutâmico é ideal para obtenção do sabor desejável neste tipo de queijo.

SIERRA em 1957 (216) descreveu um novo método para detecção de atividade lipolítica de microrganismo. A formação de lipase é demonstrada pela adição de Tweens ao meio nutriente. Foram utilizados 3 tipos de Tweens na concentração de 1% que diferem entre si no ácido graxo componente, sendo utilizado Tween 40 (éster de ácido palmítico), Tween 60 (éster de ácido esteárico) e Tween 80 (éster de ácido oleico). Foi preparado meio basal com peptona 1%, NaCl 0,5% e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,01%. O meio foi colocado em placas e inoculado com microrganismos em teste. Foi verificado que se o microrganismo testado apresenta atividade lipolítica um halo opaco poderia ser facilmente observado ao redor das colônias. Quando olhados microscopicamente estes halos opacos consistem de cristais formados de sabões de cálcio, sendo que o tipo de Tween utilizado determinava o tipo de cristal formado no halo. O método descrito apresentava a vantagem de permitir ótimo contato entre as células em crescimento e o substrato lipídico, que é necessário nos casos em que a formação de lipase é adaptativa, sendo permitido estudos de especificidade da lipase e visualização direta dos resultados.

HARPER em 1957 (52) estudou os sistemas de lipase usados no preparo dos queijos Romano e Provolone verificando a hidrólise seletiva de ácidos graxos, visando esclarecer o processo de maturação de queijos bem como avaliar as preparações de lipase para manufatura de queijos. Foi verificado que lipase pancreática hidrolisava predominantemente

ácidos graxos de número de carbono igual a 12 ou maiores, enquanto a lipase de Aspergillus hidrolisava ácidos graxos menores. A lipase de leite hidrolisou quantidades significantes de ácidos graxos de cadeia longa ou curta. Lipases usadas para o preparo de queijos Itálicos produzem altas concentrações de ácido butírico, o que variava com a fonte animal de lipase. Lipases de mesmo tecido ou órgão, porém de diferentes espécies animais produzem diferentes quantidades de ácidos graxos livres. A hidrólise seletiva de ácidos graxos da gordura do leite é a base para a seleção de preparações de lipases para manufatura de queijos Itálicos.

JENSEN et alii, em 1960 (82) coletaram evidências para demonstrar o modo de ação de lipases do leite e comparar com lipase pancreática. Utilizando leite pasteurizado, leite homogeneizado e leite cru misturados em igual proporção e incubados a 37°C por períodos de até 2 horas. Os resultados indicaram que lipases de leite são específicas para a posição primária da hidroxila na gordura do leite. A presença de 82,3% de 2-monoglicerídeos encontrados no sistema de reação claramente indicaram o tipo de especificidade das lipases presentes no leite de vaca.

Em 1961, ALFORD & PIERCE, (3) detectaram e compararam as atividades lipolíticas de lipases microbianas de Pseudomonas fragi, Staphylococcus aureus, Geotrichum candidum, Candida lipolítica, Penicillium roqueforti e Penicillium sp., a temperaturas abaixo de 0°C, utilizando como emulsões de óleo de

milho, óleo de côco, e toucinho como substrato. A taxa de lipólise em substratos congelados foi diretamente relacionada ao grau de insaturação dos substratos. Foi observado que óleo de côco foi o mais rapidamente atacado dos três substratos para todas as lipases exceto a de Geotrichum candidum. A lipase produzida por este microrganismo foi a mais ativa em óleo de milho, e este efeito foi ainda mais evidente a temperaturas mais baixas, mostrando evidente a preferência desta lipase pela hidrólise de ácidos graxos insaturados, sendo que ácido oleico e ácido linoleico compõem cerca de 99% dos ácidos hidrolisados pela lipase de Geotrichum candidum. De forma geral foram encontradas diferenças básicas entre as lipases microbianas de diferentes origens sendo estas enzimas ativas a baixas temperaturas, e que o tipo de ácido graxo, bem como a posição no triglicerídeo determina a atividade da lipase microbiana. A lipase de Penicillium roqueforti demonstrou afinidade por ácidos graxos de cadeia curta o que já era esperado pela utilização deste microrganismo na fabricação de "blue cheese".

RIZACK em 1961 (200) estudou a atividade lipolítica em tecido adiposo de rato, sensível à ação da epinefrina. Considerando que os ácidos graxos no tecido adiposo são armazenados como ésteres (triglicerídeos) mas são liberados como ácidos graxos livres, evidenciando que um dos fatores que regulam a liberação de ácido graxo pode ser uma lipase, o autor com este estudo visou demonstrar a ação de um sistema lipolítico com esta função. O extrato enzimático foi preparado

por homogeneização e centrifugação e extração por sacarose. A ação lipolítica foi verificada utilizando-se como substrato uma emulsão comercial de óleo de côco, albumina e tampão fosfato pH 6,8. O sistema lipolítico encontrado demonstrou ser ativado em cerca de 25 a 30% quando epinefrina estava presente no meio de incubação do tecido adiposo. Epinefrina parece agir na lipólise, ativando o sistema enzimático. Quando o tecido adiposo provinha de animal em estado de carência nutricional, os tecidos apresentaram altos níveis de atividade lipolítica, quando comparados ao tecido adiposo de animal normalmente alimentado. Portanto, foi demonstrado que este sistema lipolítico parece ser responsável pela liberação acelerada de ácidos graxos em resposta à epinefrina e ao jejum. Sua atividade aumenta durante o jejum enquanto a atividade de outro tipo de sistema lipolítico a de lipoproteína lipase diminui.

ALFORD & PIERCE em 1963 (4) relataram a produção de lipase por Pseudomonas fragi em meio sintético, verificando que pode ocorrer grande variabilidade na produção de lipase pelo mesmo organismo em diferentes meios. Para este estudo foi utilizado meio mínimo acrescido de mistura de aminoácidos, sendo que os aminoácidos arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico e lisina são responsáveis por cerca de 90% da produção total de lipase quando todos os aminoácidos estão incluídos no meio. Ácido aspártico e ácido glutâmico são comumente envolvidos nas reações de transaminação acreditando-se ser este o efeito estimulante na síntese de lipase destes

aminoácidos devido à propriedade destes em sintetizar outros aminoácidos. Vitaminas não apresentam efeito aparente na produção de lipase.

ALFORD et alii, em 1964 (5) estudaram a atividade de lipases microbianas em gorduras naturais e triglicerídeos sintéticos. A lipase produzida por Pseudomonas fragi apresentou atividade lipolítica similar à lipase pancreática, atacando as posições primárias do triglicerídeo, posições 1-(3). Neste estudo foram isolados 82 microrganismos, dos quais apenas 13 produziram lipase com atividade significativa, sendo selecionados linhagens de Pseudomonas fragi, Staphylococcus aureus e Geotrichum candidum dentre outras. A lipase produzida por P. fragi apresentou atividade lipolítica similar a lipase pancreática, atacando as posições primárias 1-(3) do triglicerídeo. Esta lipase assim como a lipase pancreática, ataca mono e diglicerídeo em taxas muito mais baixas que quando atuam sobre triglicerídeos. A lipase produzida por S. aureus, pode atacar a 2-posição tanto quanto a 1-posição do triglicerídeo. Estes resultados puderam ser obtidos utilizando-se triglicerídeos sintéticos. Esta enzima parece demonstrar uma ligeira preferência para hidrólise de ácido oleico do que para hidrólise de ácido esteárico. O reagente diisopropil fosfofluoridrato na concentração $10^{-4}M$ não apresentou efeito inibidor indicando não ser esta enzima uma esterase. Com relação à lipase de G. candidum ficou evidenciada a preferência para o ácido graxo insaturado, ácido oleico, independente de

sua posição no triglicerídeo. Utilizando os triglicerídeos sintéticos 2-oleoil palmito-estearina, 2-palmitoil diestearina e 2-estearoil-dipalmitina os autores observaram que a ligação com ácido palmítico é mais facilmente atacada que a ligação com o ácido esteárico, entretanto, nenhum é atacado a taxa rápida. Os demais microrganismos selecionados demonstram o perfil de atividade similar as lipases de P. fragi e S. aureus.

LUDDY et alii, em 1964 (133) estabeleceram um procedimento para hidrólise de triglicerídeos por lipase pancreática utilizando uma técnica que necessita de micro-quantidades de triglicerídeos, que poderia ser utilizada em investigações bioquímicas e no fracionamento de lipídeos. Foi utilizado 50 mg de triglicerídeo, pancreatina, tampão fosfato 0,1 ml, CaCl_2 . O frasco que contém a mistura de reação era aquecido a 40°C sem agitação por 1 minuto. Depois agitado a 3000 rpm. Os produtos de reação são extraídos com éter etílico. Como o método se baseia em hidrólise muito rápida não ocorre migração dos monoglicerídeos ou diglicerídeos.

VAUGHAM et alii, em 1964 (250) caracterizaram a atividade de lipase hormônio-sensível em tecido adiposo de rato sem interferência de outras lipases. Além disto os autores investigaram a atividade de lipase presente em tecido adiposo de ratos e coelhos que apresenta especificidade para a hidrólise de monoglicerídeo. A atividade do sistema de lipase hormônio-sensível apresenta pH ótimo próximo a 7,5. Foi verificado que a atividade deste sistema podia ser restaurada

pela exposição do tecido à epinefrina, norepinefrina e hormônio adrenocortico-trópico, sendo que a incubação do tecido intacto com norepinefrina aumenta a atividade da lipase hormônio-sensível em cerca de 2 a 3 vezes. A lipase que age sobre monoglicerídeos apresenta pH ótimo próximo a 8,0. Os estudos demonstraram que esta lipase presente em tecido adiposo de rato apresenta alto grau de especificidade para monoglicerídeo. Esta enzima pode ser responsável pela posterior degradação de monoglicerídeos gerados pela ação da lipase hormônio-sensível. A lipase que apresenta especificidade para monoglicerídeo cliva 2-monoglicerídeo muito mais rapidamente que 1-monoglicerídeo.

JENSEN et alii, em 1965 (86) estudaram a especificidade de lipase produzida por Geotrichum candidum para o ácido cis-octadecenoico constatando que esta enzima não hidrolisa o isômero trans do ácido oleico. Esta especificidade única para lipases indicou, segundo os autores que a enzima pode ter um sítio ativo relativamente largo ligando o carbono da carbonila e a dupla ligação e que o comprimento dos últimos nove carbonos na cadeia de C_{18} parece ser importante porque ésteres de $C_{14,1}$ são hidrolisados a taxas muito inferiores que os oleatos.

MATTSON & VOLPENHEIN em 1966 (142) descreveram a hidrólise enzimática na interface óleo/ H_2O em ratos adultos. Foi observado que a habilidade da lipase pancreática para hidrolisar triglicerídeos é extremamente elevada e que esta enzima não pode hidrolisar substratos solúveis em H_2O , tendo

portanto a propriedade de ser funcional somente na interface óleo/ H_2O . Considerando que a enzima é solúvel em H_2O enquanto o substrato é insolúvel neste meio, um fator importante passa a ser a taxa na qual os reagentes difundem-se para a interface e a taxa na qual os produtos difundem-se da interface. Para que a enzima aja no triglicerídeo a ligação éster deve estar localizada na interface óleo/ H_2O disponível para a enzima. Esta exata orientação do triglicerídeo na interface não é conhecida. Os autores relatam que a remoção do ácido graxo livre que resulta da hidrólise de triglicerídeo para diglicerídeo é de grande importância. É reconhecido que ácidos graxos livres são inibidores da hidrólise, esta sua ação deve-se ao acúmulo de ácido graxo na interface bloqueando a formação do complexo enzima-substrato e consequentemente diminuindo a velocidade de reação. Quando triglicerídeos são hidrolisados por lipase, há um acúmulo inicial de diglicerídeos, subsequentemente monoglicerídeos são formados, sendo estas reações reversíveis. Estas observações devem significar que o complexo enzima-glicerídeo parcial é quebrado após cada passo hidrolítico e uma nova associação da molécula enzima com o triglicerídeo ou diglicerídeo é formada. Então cada passo hidrolítico envolve não somente a difusão do ácido graxo resultante, mas também a difusão da enzima para um novo sítio na interface óleo/ H_2O . Com relação ao papel da bile este ainda não está plenamente esclarecido se considerar que "in vivo" triglicerídeos podem

ser hidrolisados sem a presença da bile. A bile acelera a hidrólise de triglicerídeos embora tal evidência ainda não seja conclusiva.

LAWRENCE em 1967 (120) descreveu as classes de enzimas lipolíticas relatando que o termo "lipase" comumente usado por microbiologistas não é muito diferente do termo esterase que significa enzimas que hidrolisam somente ligação éster, e a linha divisória entre lipases e esterases não é bem definida. Lipase foi definida de acordo com a União Internacional de Bioquímica como glicerol éster hidrolase (E.C. 3.1.1.3) em 1961. O autor relata que alguns microbiologistas consideram que as lipases microbianas podem hidrolisar estères emulsificados de glicerol enquanto que esterases hidrolisam substratos perfeitamente solúveis. Foi enfatizado que apesar da forma na qual podem ser feita a classificação entre esterases e lipases, nenhuma única propriedade permite a distinção geral entre esterases e lipases microbianas. A definição mais satisfatória, mas puramente arbitrária parece ser a que lipases atacam triglicerídeos insolúveis simplesmente porque eles são os substratos naturais mais comuns, atacados por lipases microbianas. Esta definição deverá ser certamente alterada quando os substratos fisiológicos destas enzimas sejam determinados.

LAWRENCE et alii, em 1967 (121) descreve os métodos usados para estimar a atividade de lipase e os fatores que afetam a velocidade da hidrólise. A atividade hidrolítica da

lipase depende da estrutura do ácido graxo e do álcool no substrato. A diferença na extensão da hidrólise de vários triglicerídeos sintéticos e naturais pode ser atribuída somente à sua constituição de ácidos graxos. A especificidade das lipases de alguns microrganismos parece estar relacionada à posição do ácido graxo no triglicerídeo e em outros casos ao próprio ácido graxo e seu grau de insaturação.

KHAN et alii, em 1967 (91) estudando a produção e as propriedades de uma lipase produzida por Achromobacter lipolyticum verificaram que a quantidade máxima de lipase produzida extracelularmente ocorria quando o microrganismo foi incubado a 21°C por 36 horas em meio Casitone a pH 7,0. A adição de óleo de oliva 1%, óleo de milho 1% ou gordura de leite 1% e agitação branda estimulou a produção de lipase em cerca de 3 vezes. A enzima produzida possuía pH ótimo de 7,0 e temperatura ótima de 37°C, e alta resistência térmica, pois o aquecimento a 71°C por 180 minutos destruía a atividade em somente 47%. A atividade enzimática foi estimulada por vários sais, sendo que MgCl₂ foi o de maior efeito. A gordura de leite foi lipolizada mais rapidamente que os óleos de milho e de oliva. A atividade lipolítica foi medida utilizando-se vários tipos de tampões a pH 7,0. Na presença de tampão fosfato de potássio que foi observada maior atividade lipolítica. A lipase de Achromobacter apresentou taxas de reação para oleilglicerídeos mais altas que para butirilglicerídeos, revelando que a enzima possivelmente é mais ativa para glicerídeos que

contenham ácidos graxos insaturados de cadeia longa. Sua especificidade assemelha-se a lipase de Geotrichum candidum, sendo a primeira lipase bacteriana reportada que apresenta esta especificidade.

YOSHIDA et alii, em 1968 (260) descreveram as propriedades físico-químicas da lipase de Torulopsis ernobii que foi produzida extracelularmente, apresentando ponto isoelétrico em pH 2.95. Esta lipase hidrolisa óleo de oliva a pH 6,5. O peso molecular foi estimado em 42.500, sendo determinado a presença de 15,5% de manose ligada à proteína.

No mesmo ano, YOSHIDA et alii, (261) estudaram o efeito de material lipídico na produção de lipase por Torulopsis ernobii. A enzima mostrou ser estável a ácidos pois mesmo tratada a pH 2,5 por 60 minutos a 37°C, apenas 20% da atividade foi destruída. A fermentação para obtenção da lipase foi realizada pelo cultivo do microrganismo contendo 1,5% de farinha de soja desengordurada, 1% farinha de trigo, 0,3% de levedura seca e 0,2% NH_4NO_3 a pH 5,0. O meio foi incubado a 33°C por 25 a 40 horas. O meio de cultivo foi adicionado de óleos e gorduras na concentração de 0,2%, tendo sido a atividade lipolítica aumentada de 18 a 97% em 40 horas e a maior atividade foi obtida com a adição de óleo de oliva. Foram testadas várias concentrações de óleo de oliva em relação ao meio de cultura, sendo que na concentração de 0,2 a 0,6% há um aumento máximo na produção de lipase. Concentrações maiores que 0,8% apresentam aumento menos significativo da produção de

lipase. Ácidos graxos com números de carbonos inferiores ao ácido láurico exerciam efeito inibitório na produção de lipase, na concentração de 0,2%. Glicerol na mesma concentração não apresenta efeito.

SOMKUTI & BABEL em 1968 (222) estudaram atividade lipolítica de Mucor pusillus de linhagens utilizadas na preparação rotineira de protease para coagulação de leite. O sistema de reação para determinação da atividade de lipase continha taurocolato de sódio e cloreto de cálcio, tendo sido usado como substrato uma emulsão de gordura de manteiga a qual foi incubada a 35°C por 2 horas. Os autores relatam que esta enzima parece ser produzida extracelularmente. Foram testados vários substratos tanto com ácidos graxos saturados como com ácidos graxos insaturados os quais foram hidrolisados por esta lipase.

MARKS et alii, em 1968 (138) estudando a especificidade de um sistema de lipases de Geotrichum candidum verificaram que apesar de já ser relatado na literatura que este microrganismo elabora lipase extracelularmente e preferencialmente hidrolisa ácido cis-octadecenoico, proveniente de uma variedade de gorduras naturais e sintéticas, a aplicação desta lipase para a determinação da estrutura de triglicerídeo não é recomendada pela falta de informação sobre as propriedades e especificidade da enzima. Foram utilizados neste estudo quatro triglicerídeos possíveis de oleato e palmitato, variando-se o pH de incubação do sistema enzimático.

O sistema de reação empregou goma arábica a 1% como agente emulsificante, sendo confirmada a hidrólise preferencial de ácido oleico independente da posição no triglicerídeo. O pH ótimo de atividade foi verificado ser de 8,1 a 8,5 e não o pH usado em prévios estudos (pH 6,7), sendo que nas condições empregadas a extensão da digestão foi quase dobrada pelo aumento do pH de 6,7 para 8,5. Os autores relatam que a especificidade da lipase de G. candidum sugere um interessante exemplo de geometria do sítio ativo.

SOMKUTI et alii, em 1969 (223) estudaram algumas características da lipase produzida por Mucor pusillus e compararam as propriedades desta enzima com as propriedades de outras lipases fúngicas. A enzima foi produzida em suspensão de farelo de trigo a 2% e incubação por 5 dias a 35°C, tendo sido observado que além da atividade de hidrolisar triglicerídeos, esta lipase apresenta atividade de esterase sobre ésteres metílicos de ácidos graxos. Tanto a filtração em gel realizada como a cromatografia em troca iônica em DEAE-Sephadex apresentaram atividade de esterase e lipase numa mesma região, sugerindo a possível presença de somente uma enzima. A atividade de esterase foi dependente do comprimento da cadeia do ácido graxo e a ação foi maior contra metildodecanoato indicando que um comprimento mínimo da cadeia de 6 carbonos foi necessário para que a enzima hidrolise ésteres. Segundo os autores o pH ótimo de atividade para hidrólise de trioctanoína, óleo de oliva e metil dodecanoato está entre 5,0 e 5,5, o que é

similar aos valores reportados para outras lipases fúngicas. Compostos como cisteína, 2-mercaptoetanol, agentes quelantes (EDTA), monoiodoacetato, paracloromercúriobenzoato (PCMB) não exerceram efeito na ação de glicerol-ester-hidrólise bem como na ação esteárica. Estes resultados parecem indicar que a lipase não é uma metaloenzima e não requer grupos SH-livres, ou ponte dissulfeto (S-S) intacta para atividade.

A lipase de Pseudomonas fragi, foi purificada e estudada quanto às suas características por LU & LISKA em 1969 (131), tendo sido observado que a aeração do meio de cultura causou perda da atividade enzimática. A maior quantidade de atividade de lipase foi precipitada com 60% de saturação com sulfato de amônio. O fracionamento foi realizado com acetona fria (4°C) e a enzima foi altamente purificada por cromatografia em coluna de DEAE-celulose. A lipase de P. fragi demonstrou ser estável na forma precipitada por sulfato de amônio mas esta estabilidade diminui com a purificação. Esta observação exclui a possibilidade de que enzimas proteolíticas presentes no extrato bruto causassem a instabilidade da lipase de P. fragi, sendo possível que algumas substâncias presentes na lipase não purificada exercessem efeito protetor na estrutura da enzima.

LU & LISKA em 1969 (132) estudaram as propriedades da lipase de Pseudomonas fragi purificada. Foi utilizado óleo de côco como substrato, e o pH ótimo encontrado esteve na faixa entre 7,5 e 8,9. Na faixa de temperatura entre 17 e 54°C a taxa

de reação foi maior. A lipase de P. fragi foi termorresistente, perdendo somente 27,1% de atividade após 1 hora de tratamento a 42°C. A inativação foi completa a 66°C após 1 hora de tratamento ou a 71°C por 10 minutos. Esta lipase hidrolisou ésteres sintéticos de ácidos graxos, assim como gorduras naturais. Trilaurina foi hidrolisada mais rapidamente seguida por tricaprina, tripalmitina, tributirina.

VERGER et alii, em 1969 (252) purificaram duas espécies moleculares com atividade de lipase, isoladas de pâncreas de porco. Neste estudo foi utilizado a homogeneização de pâncreas fresco e centrifugação do homogenato. O sobrenadante foi fracionado com sulfato de amônio, e foi submetido a cromatografia em coluna com DEAE-celulose a pH 8,0. Os autores encontraram duas lipases designadas L_A e L_B , parecendo existir diferenças entre os pontos isoelétricos das duas proteínas. Na cromatografia em coluna de DEAE-celulose L_B emerge mais rápido que L_A . Como as lipases estavam altamente contaminadas com lipídeos a tentativa da completa remoção destes lipídeos levou à extensiva inativação da enzima. A composição de aminoácidos de L_A e L_B parece ser muito similar. As enzimas apresentaram peso molecular semelhante, estando na faixa de 45.000 a 50.000.

NAGAOKA et alii, em 1969 (158) relataram a produção de lipases utilizando linhagem isolada de Mucor sp. O microrganismo foi cultivado em meio líquido consistindo de 4% de amido solúvel, 3% de farelo de soja, 0,1% $(NH_4)_2SO_4$ e 0,2% de K_2HPO_4 , pH 6,5. A produção de lipase foi extremamente

afetada pela fonte de nitrogênio do meio sendo que a combinação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e farelo de soja parece ser a mais adequada. A enzima apresentou pH ótimo de 8,0 para o substrato óleo de oliva a 37°C.

EITENMILLER et alii, em 1970 (35) estudaram a produção e as propriedades da lipase produzida por Penicillium roqueforti, verificando os fatores que afetam a produção de lipase pelo microrganismo, e os fatores que afetam a atividade da enzima. A produção de lipase de P. roqueforti é afetada intensamente pela fonte de nitrogênio e dentre os diversos meios de cultura testados o que apresentava uma fonte de nitrogênio orgânico complexa levou a uma maior produção de lipase. Os autores adicionaram óleo de oliva, gordura de leite, óleo de milho ao meio de cultura na concentração de 1%, com incubação de 7 dias a 27°C. Todos os lipídeos acrescentados causaram uma diminuição na produção de lipase. O pH do meio de cultura para maior produção da enzima foi verificado ser 5,5 e quando o pH aumenta a produção de enzima diminui. A temperatura ideal para incubação visando maior produtividade da enzima de Penicillium roqueforti é 27°C. A enzima foi parcialmente purificada por fracionamento com sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e caracterizada quanto a atividade lipolítica. O pH ótimo foi verificado ser 8,0 e a temperatura ótima de 37°C. A enzima não é termorresistente sendo inativada completamente quando submetida a 50°C por 10 minutos. Dentre os vários substratos estudados os

triglicerídeos de cadeia curta são hidrolisados preferencialmente, a tributirina e a tricaprilina mostraram ser os substratos mais adequados para ação desta lipase.

HUTTUNEM & STEINBERG em 1971 (65) descreveram a ativação e fosforilação de lipase hormônio-sensível de tecido adiposo de rato onde foi estudado o efeito de ativação de Adenosina Monofosfato (AMP) cíclico, Adenosina Trifosfato (ATP) e proteína Kinase. A ativação desta enzima purificada depende totalmente da adição de proteína kinase tanto para o AMP quanto para o ATP. Os resultados evidenciaram que a ativação hormonal da lipase de tecido adiposo é mediada pelo AMP-cíclico e que este AMP atua via proteína kinase possivelmente devendo ocorrer conversão de lipase inativa a lipase ativa pela fosforilação da enzima, o que explicaria a rápida mobilização de ácidos graxos livres de tecido adiposo onde eles estão armazenados na forma de triglicerídeos. Esta mobilização é feita pela clivagem da primeira ligação éster do triglicerídeo, realizado pela lipase hormônio-sensível.

KOSUGI & KAMIBAYASHI em 1971 (108) isolaram do solo uma linhagem de bactéria identificada como Pseudomonas sp que produzia lipase termoestável. A lipase foi produzida quando o meio de cultura líquido foi incubado de 23 a 37°C com aeracão, e agitação. A lipase produzida foi termoestável e estável frente a uma larga variação de pH. A adição de óleo de oliva, gordura de boi e óleo de amendoim tiveram grande efeito na produção de lipase mais que gordura de côco ou óleo de mamona.

Durante o cultivo para a produção de enzima foi verificado a necessidade de condições altamente aeróbicas necessitando uma grande quantidade de oxigênio dissolvido. A enzima apresentou temperatura ótima de 70°C e pH ótimo de 7,0.

TSUJISAKA et alii, em 1972 (242) fizeram estudo comparativo de algumas propriedades de lipases fúngicas. Foram comparadas as lipases de Aspergillus niger, Rhizopus delemar, Geotrichum candidum e Penicillium cyclopium. Com relação ao meio de cultura para produção de lipase foi verificado que A. niger produzia lipase em meio semi-sólido composto de farelo de trigo e CaCO_3 . Os outros 3 fungos produziram grande quantidade de lipase durante o crescimento em meio líquido. Este meio tinha como característica alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbonos. Para Penicillium cyclopium o meio de cultura mais adequado continha farelo de arroz e água de maceração de milho. Segundo os autores todas as lipases produzidas podem ser classificadas na categoria de glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3 por sua ação catalítica. A ação de síntese das lipases sobre ácidos graxos e glicerol foi verificada produzindo monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos. As lipases de Aspergillus niger e Rhizopus delemar demonstraram ter larga especificidade para vários ácidos graxos e grande atividade de síntese, em relação as duas outras lipases. A lipase de P. cyclopium é a que apresentou a menor taxa de esterificação. Todas as lipases foram ativadas pelo íon cálcio. Das observações feitas sobre a ativação da lipase de A. niger foi verificado que esta característica não

ocorre no início da reação enzimática sobre óleo de oliva, porém somente após o acúmulo de certa quantidade de ácido oleico é que a ativação é induzida e a reação é rapidamente acelerada. O fenômeno da ativação foi verificado ocorrer somente no caso de hidrólise de triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa. Portanto, a ativação parece depender do aumento do estado de emulsificação da mistura de reação pela formação de sais de cálcio com ácidos graxos livres. As lipases dos quatro microrganismos estudados foram severamente inibidas pelo íon Fe^{++} ou Fe^{+++} . A lipase de A. niger foi instantaneamente inativada pelo contato com o íon Fe .

TSUJISAKA et alii, em 1973 (243) purificaram a lipase de Geotrichum candidum (Link) e estudaram algumas de suas propriedades. A composição química da lipase cristalizada indicou a presença de 7,5% de manose como o componente principal entre os açúcares presentes que foram xilose, arabinose e galactose. Foi detectado também a presença de lipídeo formado de vários tipos de ácidos graxos não sendo esclarecido se a fração lipídica é necessária para a atividade enzimática ou não. A enzima foi mais ativa em valores de pH entre 5,6 e 7,0 e foi estável na faixa de 4,6 a 9,8 durante incubação por 24 horas a 30°C. A temperatura ótima foi estimada ser 40°C, e a enzima foi estável a temperaturas abaixo de 55°C a pH 5,6 por 15 minutos.

KOSUGI & SUZUKI em 1973 (109) fixaram lipase produzida por Pseudomonas lipolytica à própria célula e estudaram as propriedades desta enzima como enzima imobilizada.

A fixação da enzima à célula foi realizada centrifugando-se as células cultivadas por 12 horas. Posteriormente as células foram lavadas com tampão acetato pH 5,0 e suspensas no mesmo tampão. A suspensão foi mantida a 70°C por 30 minutos e as células foram centrifugadas, lavadas com água destilada e usadas como lipase fixada. A lipase assim fixada manteve 83% de atividade em relação à enzima solúvel produzida pelo microrganismo, e podia ser usada continuamente para hidrólise de tributirina e triacetina.

NAGAOKA & YAMADA em 1973 (159) purificaram lipases de Mucor lipolyticus Aac-0102 e estudaram algumas propriedades da lipase purificada. A fração com atividade hidrolítica sobre óleo de oliva foi separada em duas frações por cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50 e foram denominadas F-3A e F-3B. O ponto isoelétrico de F-3A foi em pH 9,7 e F-3B em pH 10,2, enquanto que o pH ótimo de F-3A foi 9,0 e F-3B 8,0. As enzimas foram estáveis na faixa de pH entre 3,3 e 10,0. A temperatura ótima para atividade de hidrólise em óleo de oliva foi de 37°C para F-3A sendo que a atividade enzimática diminuiu a 45°C. Na temperatura de 0°C, ainda havia 40% da atividade máxima. A adição de desoxicolato aumentou a atividade da enzima na faixa de temperatura entre 0 e 50°C. A fração F-3B teve temperatura ótima entre 30 e 37°C e o efeito do desoxicolato não foi tão intenso como para a lipase F-3A. As duas enzimas foram inibidas por metais pesados, como Ag⁺, Hg⁺⁺ e por agentes oxidantes como KMNO₄ e N-bromosuccimida. F-3A e F-3B apresentaram forte atividade hidrolítica sobre triglicerídeos. Com relação a

constituição de ácidos graxos do substrato F-3A apresentou fraca atividade para triglicerídeos de cadeia curta como tricaproína, tributirina e tripropionina, enquanto F-3B foi mais ativa sobre tributirina e tricaproína.

YAMAGUCHI et alii, em 1973 (257) isolaram uma linhagem de bactéria pertencente ao gênero Chromobacterium utilizando emulsão de gordura de boi como substrato no meio de cultura. A lipase obtida demonstrou pH ótimo de atividade entre 7,0 e 8,0 o que é o mesmo valor para lipase pancreática, sendo ainda bastante ativa do lado ácido do pH. A temperatura ótima para atividade lipolítica foi 65°C quando determinada a pH 7,0, porém a enzima demonstra atividade após exposição a várias temperaturas, perdendo cerca de 97% de atividade quando aquecida por 10 minutos a 100°C. Com relação à estabilidade frente ao pH a lipase de Chromobacterium demonstrou ser estável na faixa de pH 3 a 9 após 24 horas de incubação a 37°C. Os autores verificaram que os íons Cu^{++} , Hg^{++} , Sn^{++} inativam a enzima, porém os íons Ca^{++} , Mg^{++} e Mn^{++} a ativam. Com relação ao tipo de substrato a enzima mostrou-se mais ativa em gordura animal que vegetal.

SORHAUG & ORDAL em 1974 (227) demonstraram que linhagem de Brevibacterium linens apresentou atividade de lipase e esterase somente nas preparações de células intactas. Quando o meio de cultura livre de células foi testado quanto à atividade de lipase ou esterase nenhuma atividade foi

detectada. A taxa de lipólise nas preparações de células intactas foi maior quando o substrato utilizado foi tributirina.

BENZONANA em 1974 (16) descreveu algumas propriedades de uma lipase exocelular produzida por Rhizopus arrhizus. Quando a enzima é purificada por cromatografia em coluna de Amberlite a atividade de lipase emerge em dois picos denominados lipase I e lipase II. A lipase II é resultado da degradação proteolítica da lipase I e não é excretada pelo fungo como lipase II. A adição de 2 mM de diisopropilfluorofosfato (DPP) para um meio contendo lipase I susta a formação de lipase II. Os pesos moleculares das duas enzimas são descritos como 40.000 e 30.000 respectivamente para as lipases I e II. A lipase I é rica em carboidratos enquanto que a lipase II não os apresenta. A fração de carboidrato pode ser liberada da lipase I como glicopeptídeo de peso molecular 8.500. O papel da fração de carboidrato permanece obscura, na catálise da enzima. Quanto à especificidade o autor relata que a lipase de Rhizopus arrhizus assemelha-se à lipase pancreática rompendo a ligação éster das posições 1 e 3.

IWAI & TSUJISAKA em 1974 (71) purificaram e descreveram as propriedades de três espécies de lipases de Rhizopus delemar. As lipases foram denominadas A, B e C e demonstraram ação catalítica similar. O pH ótimo foi determinado com óleo de oliva como substrato a 30°C por 60 minutos. O valor de pH ótimo 5,6 foi o mesmo para as três enzimas. Com relação a temperatura ótima a lipase A apresentou

melhor atividade à temperatura de 30°C e para lipases B e C a temperatura foi 35°C. O pH de estabilidade foi encontrado na faixa de 3 a 8 para lipase A, enquanto as lipases B e C foram estáveis na faixa de 4 a 7. A termoestabilidade das enzimas foi determinada pelo tratamento por 15 minutos a várias temperaturas, em pH 5,6. As lipases B e C foram estáveis nas temperaturas abaixo de 45°C enquanto que a lipase A foi estável mesmo a 60°C. Os autores relatam que a lipase A apresenta estrutura proteica diferente das lipases B e C que podem apresentar identidade.

KHOO et alii, em 1974 (94) estudaram o mecanismo de ativação de lipase hormônio-sensível em tecido adiposo humano, verificando que este tipo de lipase sofre ativação pela ação da proteína kinase dependente do nível de AMP-cíclico, estabelecendo que a interação com o receptor hormonal leva ao aumento da atividade da adenilato ciclase que aumenta o nível de AMP-cíclico. Este faz ativação da proteína-kinase AMP-cíclico dependente que ativa a lipase hormônio-sensível. A especificidade da proteína kinase endógena com relação ao nucleotídeo cíclico e nucleotídeo trifosfato foi similar àquela de músculo de coelho e tecido adiposo de rato. Os autores concluem que a ruptura da primeira ligação éster no triglicerídeo é limitante para a taxa de hidrólise, e que a diglicerídeo lipase e monoglicerídeo lipase apesar de estarem presentes em alta atividade não são afetadas pelo controle hormonal.

KHOO & STEINBERG em 1974 (95) estudaram a desativação reversível de lipase hormônio-sensível de tecido adiposo de galinha pela proteína kinase, sendo detectado um sistema que rapidamente desativa esta enzima que foi ativada pela proteína-kinase. A enzima inativada pode ser integralmente reativada repetindo-se o tratamento com AMP-cíclico, ATP e proteína-kinase. A fração parcialmente purificada de lipase apresentava atividade de diglicerídeo lipase, monoglicerídeo lipase e lipoproteína lipase. As atividades de diglicerídeo e monoglicerídeo lipase foram cerca de dez vezes mais ativas que a triacilglicerol lipase, mas pouca ou nenhuma ativação destas lipases ocorreu pelo sistema de proteína-kinase, que nas mesmas condições triplica a atividade de triacilglicerol lipase, o que significa que estas duas lipases não estão sob controle hormonal.

VADEHRA em 1974 (248) descreveu as lipases de Staphylococcus verificando que a produção de lipase é dependente do tempo de incubação e que após 5 dias a 37°C sob constante agitação não há aumento da produção de lipase. A enzima purificada apresentou pH ótimo de 8,0 e a temperatura ótima foi de 45°C. A estabilidade térmica desta lipase foi surpreendente, pois apenas 6% da atividade foi perdida após 30 minutos de aquecimento a 50°C, sendo completamente inativada a 70°C quando aquecida por 30 minutos. Com relação ao tipo de substrato a enzima não demonstrou alguma preferência particular, sendo todos os substratos testados dentre os óleos e gorduras naturais, hidrolisados na mesma extensão.

IWAI et alii, em 1975 (70) compararam as propriedades de duas lipases de Penicillium cyclopium Westring, obtidas através do fracionamento da enzima bruta por cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50. A estabilidade do pH para as duas lipases denominadas lipase A e lipase B foram de 6,5 a 9,0 e de 4,0 a 6,5 para A e B respectivamente, o pH ótimo de atividade foi 7,0 para a lipase A e 6,0 para a lipase B. Com relação à ação hidrolítica sobre vários substratos, as atividades de ambas as enzimas foi mais elevada sobre óleos vegetais ricos em ácidos graxos de cadeia longa e insaturados como os presentes em óleo de oliva. Em óleos compostos principalmente de ácidos graxos com duplas ligações conjugadas a atividade foi baixa. Não foi encontrada diferença significativa nas ações destas lipases sobre os óleos vegetais testados. O peso molecular das enzimas foi verificado ser 27.000 para lipase A e 36.000 para lipase B. Como as propriedades entre as duas enzimas são diferentes os autores concluem que Penicillium cyclopium produz separadamente duas espécies de lipases com estruturas proteicas diferentes entre si.

ISHIHARA et alii, em 1975 (66) estudaram as propriedades da lipase purificada produzida por Mucor javanicus, verificando que esta lipase apresenta aproximadamente 2,6% de carboidrato. O pH ótimo de atividade foi 7,5 quando o substrato utilizado foi trioleína. Esta enzima exibiu atividade de fosfolipase A1 pois hidrolisou a ligação éster na posição 1 da fosfatidilcolina. A temperatura ótima de ação da lipase foi determinada ser 37°C e a atividade foi

rapidamente perdida à temperaturas acima de 40°C. A lipase foi fortemente inibida pela adição de solução de fluoreto de sódio 0,2M, porém não foi inibida pela adição de NaCl 0,5M. A lipase de Mucor tem especificidade posicional em relação as posições 1 e 3 do triglicerídeo.

TORNQUIST & BELFRAGE em 1976 (238) analisaram as propriedades de monoacilglicerol lipase purificada de tecido adiposo de rato, sendo que para este estudo foi necessário solubilizar a enzima com polioxietilenoglicol para produzir enzima estável em condições para ser analisada quanto às suas propriedades. A monoacilglicerol lipase foi extraída de gordura de epiderme pela precipitação com ácido acético até pH 5,2 e purificada em coluna de Sephadex G-200. O pH ótimo da enzima purificada foi aproximadamente 8,0 e perdeu rapidamente sua atividade quando pré-incubada por 5 minutos à temperaturas acima de 44°C, sendo completamente inativada a 60°C. Com relação a especificidade quanto ao substrato, 2-monoleoilglicerol foi hidrolisado na mesma taxa que 1(3)-monoleoilglicerol com Km determinado a 21°C e pH 7,4 para ambos os substratos 0,2 mM, não apresentando atividade na presença de dioleilglicerol. O substrato sintético p-nitrofenilacetato foi hidrolisado à taxa similar do monoleoilglicerol. Com relação à inibidores, cloreto de mercúrio 1 mM e diisopropil fluorofosfato 10 mM inativaram completamente a enzima purificada.

OKUMURA et alii, em 1976 (174) determinaram as especificidades posicionais de quatro espécies de lipases microbianas: Aspergillus niger, Rhizopus delemar, Geotrichum candidum e Penicillium cyclopium. Da ação destas enzimas sobre o substrato trioleína foi concluído que lipases de A. niger e R. delemar não hidrolisam a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo. Quando o substrato utilizado foi dioleína, estas duas lipases hidrolisam 1,3-dioleína em preferência à 1,2(2.3) dioleína. As lipases de G. candidum e P. cyclopium hidrolisam todas as ligações éster do triglicerídeo apesar de sua posição no triglicerídeo.

KINSELLA & HWANG em 1976 (102) estudaram a biossíntese de "flavor" pelo Penicillium roqueforti. Convencionalmente a maturação de "Blue cheese" é realizado em 90 dias a 10°C, com umidade relativa acima de 90%. O fungo cresce através do queijo e durante o período de maturação este esporula ocorrendo proteólise, lipólise, metabolismo de ácido graxo e compostos de "flavor" são progressivamente gerados. A qualidade do "Blue cheese" depende do metabolismo do substrato lipídico no queijo. Os ácidos graxos são produtores de odor e são precursores de metilcetonas. Na ausência de lipólise adequada o "flavor" é pobre e se desenvolve vagarosamente. Durante a maturação os triglicerídeos são progressivamente hidrolisados à monoglicerídeos e ácidos graxos livres. A hidrólise de triglicerídeos é predominantemente causadas pela lipase de P. roqueforti. O microrganismo apresenta duas lipases uma intracelular e outra extracelular. A intracelular é

altamente ativa e tem temperatura ótima de 32°C. O mecanismo de formação de metilcetonas a partir de ácidos graxos começa pela via da β -oxidação. O β -cetoácido obtido sofre ação da enzima β -cetoácido descarboxilase o que leva a formação de alcanonas. Os autores relatam que têm sido patenteados métodos de obtenção de lipolizados de gordura de leite pela adição de P. roqueforti num meio contendo caseína e gordura de leite.

McMAHON et alii, em 1977 (145) identificaram atividade de glicerol-éster hidrolase na polpa de dente de bezerro ainda não erupcionado. Porção de polpa homogeneizada com tampão Tris pH 8,0 0,25M foi aplicada em emulsão preparada de óleo de oliva, tampão Tris e CaCl_2 0,1M. O produto de digestão foi titulado contra KOH alcoólico, tendo sido demonstrado que atividade de glicerol éster hidrolase (E.C. 3.1.1.3) está presente na polpa do dente de bezerro, porém o papel da enzima no metabolismo do tecido dentário não é conhecido.

SEVERSON et alii, em 1977 (211) demonstraram o papel de fosfoproteínas fosfatases na desativação reversível de lipase hormônio-sensível de tecido adiposo de galinha. Como a ativação deste tipo de lipase é catalisada por uma proteína kinase AMP cíclico dependente, pode ser inferido que a desativação desta enzima é catalisada por uma lipase fosfatase. Os autores concluem que os dados obtidos evidenciam que a desativação foi enzimática, sendo completamente reversível quando o sistema era incubado com ATP Mg^{++} e AMP cíclico. A desativação total foi afetada pela adição de fosfatases

isoladas de diferentes tecidos incluindo fígado de rato e coelho, coração de rato e gordura da epiderme de rato. O que confere baixo grau de especificidade na reação.

MOSKOWITZ et alii, em 1977 (153) descreveram as propriedades da esterase de Mucor miehei e a hidrólise de gordura animal e óleo vegetal por esta enzima. O pH ótimo da enzima foi verificado ser 8,5 quando medido a 37°C usando óleo de oliva como substrato. A atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura até 45°C. Acima de 45°C a atividade enzimática rapidamente diminui. A esterase de Mucor miehei tem uma larga faixa de estabilidade frente ao pH, variando de 4,0 a 9,0. Ainda a pH 10,0 a enzima retém 93% de atividade após 4 horas de incubação a temperatura ambiente. A enzima não é inibida por uma variedade de inibidores sulfidrílicos como paracloromercúrio benzoato, iodoacetamida e ácido iodoacético. Portanto, nem grupos sulfidrílicos nem cofatores metálicos são requeridos para atividade. O sal biliar taurocolato de sódio estimula a reação em cerca de duas vezes a pH 8,0 e aproximadamente cinco vezes a pH 6,5. Os autores consideram esta enzima uma esterase por ela ter apresentado taxa de hidrólise para substrato solúvel 1,21 vezes a taxa de substrato insolúvel já que para a classificação em lipases e esterases leva-se em consideração a ação sobre substratos solúveis ou insolúveis.

WATANABE et alii, em 1977 (255) isolaram e identificaram lipase alcalina microbiana, estudaram as condições para cultivo dos microrganismos visando a produção da

enzima e estudaram algumas propriedades da enzima bruta. Duas linhagens isoladas foram identificadas como Pseudomonas nitroreducens e Pseudomonas fragi. As condições ótimas para cultivo dos microrganismos foram pH inicial de 8,2-8,7 para P. nitroreducens e 6,6-7,0 para P. fragi, a temperatura entre 23-26,5°C e agitação de 300 rpm. A enzima produzida foi precipitada com pH 4,0. As características bioquímicas foram determinadas no extrato bruto enzimático. O pH ótimo para ambas lipases foi encontrado ser 9,5, embora a lipase de P. nitroreducens tenha demonstrado alta atividade mesmo a pH 10. As enzimas foram estáveis entre os pH 5 e 11. A temperatura ótima para lipase de P. fragi foi de 75 a 80°C. Surfactantes iônicos inibiam as enzimas fortemente. A linhagem de P. fragi produziu lipase extracelular e lipase ligada à célula, porém a taxa de produção de lipase extracelular para lipase ligada à célula foi diferente de acordo com as condições de cultivo. A lipase de P. nitroreducens apresentou alta produtividade de lipase alcalina.

KHOO et alii, em 1977 (96) estudaram a ativação de lipase hormônio-sensível e fosforilase kinase por proteína-kinase GMP cíclico dependente verificando que proteína-kinase GMP cíclico dependente catalisa a mesma fosforilação catalisada por proteína-kinase AMP cíclico dependente.

A reação inversa catalisada pelas lipases, reação de esterificação foi descrita por TSUJISAKA et alii, em 1977 (244), em quatro lipases microbianas, estas lipases foram obtidas de Aspergillus niger NRRL-337, Rhizopus delemar ATCC-

34612, Geotrichum candidum ATCC-34614 e Penicillium cyclopium ATCC-34613 foram purificadas até homogeneidade e estudadas quanto as suas propriedades. O sistema de reação para a síntese de glicerídeos consistiu de 4 ml de glicerol, 1 ml de água, 0,1 ml de solução de enzima e 0,1 g de ácido oleico. As quantidades de glicerídeos sintetizados pelas lipases de G. candidum e P. cyclopium foram muito inferiores (cerca de 10%) que pelas lipases de A. niger e R. delemar (cerca de 60%). Para testar o efeito de várias espécies de compostos, como emulsificantes, tampões e proteínas, estes foram adicionados aos sistemas de reação na presença das lipases de G. candidum e P. cyclopium. Quando foram adicionados caseína, albumina e tampão pH de 6,5 a quantidade de síntese de glicerídeo aumentou, porém os emulsificantes não apresentaram efeito. A concentração de glicerol na mistura glicerol/ácido graxo interferiu no grau de síntese de glicerídeos. Quando esta concentração era cerca de 80% as lipases foram mais ativas. Com relação às especificidades posicionais na reação de síntese de glicerídeos foram detectados, como produtos de reação foi utilizado ácido oleico como substrato os seguintes triglicerídeos 1(3) monoleína, 1,3 dioleína para as enzimas de A. niger e R. delemar nos estágios iniciais da reação. Após um longo período de reação pequena quantidade de 1,2 (2,3) dioleína e trioleína foram detectados. Por outro lado, 1(2) e 2-monoleína, 1,2(2,3) e 1,3-dioleína e trioléina foram detectados como produtos de síntese da ação de lipases de G. candidum e P. cyclopium.

A influência das condições nutricionais e de cultivo na produção de lipase de Aspergillus niger em cultura submersa foi estudada por PAL et alii, em 1978 (180). A temperatura ótima para fermentação foi 35°C, o pH do meio no qual a produção de lipase era maior foi de 7,0, o período de incubação ideal foi 96 horas. Dentre as fontes de carbono testadas para a produção da enzima, a sacarose induziu crescimento apreciável e alta formação de enzima. A concentração ótima de sacarose para síntese de lipase foi 1%. Quando foi utilizada a fonte de nitrogênio nitrato de amônio na concentração de 0,1% esta produziu a melhor taxa de crescimento e melhor produção de lipase. Os sais $MgSO_4$ e $FeSO_4$ desempenharam importante papel na produção de lipase, a concentração ótima foi determinada ser 0,1% para $FeSO_4$ e 0,04% para $MgSO_4$. A adição de lipídeos ao meio de fermentação aumenta a produção de lipase. Gordura de manteiga e óleo de oliva causaram o melhor crescimento celular e melhor produção de enzima, sendo que a concentração ótima de óleo de oliva foi 1%.

STEVENSON et alii, em 1979 (230) pesquisaram o emprego de lipase pancreática para a ressíntese de triglicerídeos pois tal método poderia ter a vantagem de usar condições brandas para a interesterificação diferente dos métodos químicos tradicionais. O modelo de reação foi composto de rac-gliceril-1-palmitato-2,3-dioleato (POO) que reagiu com ácido palmítico (P). Foram obtidos gliceril-2-oleato-1,3-dipalmitato (POP). POP é o triglicerídeo presente na manteiga

de cacau. Para dissolver o ácido palmítico foram testados vários volumes de hexano. O aumento do volume de hexano aumenta a concentração dos produtos obtidos com ácido palmítico. Foram obtidos de 14 a 18% de POP quando foi utilizado volume de 75-100 ml de hexano. O pH do meio de reação ótimo para produção de POP foi 6,0 a 6,5. A formação de POP parece depender da concentração de P na solução na fase oleosa.

OKUMURA et alii, em 1980 (175) purificaram e estudaram as propriedades de uma parcial-glicerídeo hidrolase de Penicillium cyclopium M1. Este microrganismo produziu duas espécies de enzimas lipolíticas. Uma delas mostrou ser mais específica para glicerídeos do que para triglicerídeos, hidrolisando monoglicerídeo mais rapidamente que todos os substratos estudados. Esta enzima foi purificada e caracterizada. O peso molecular encontrado foi 32.000 por filtração em gel, tendo ponto isoelétrico em pH 4,4. Apesar da grande quantidade de enzima adicionada, a hidrólise de trioleína não aumentou acima de 20%. Esta lipase produziu somente ácido oleico e pequena quantidade de 1,2(2,3)-dioleína através da reação, não tendo sido detectado 1,3-dioleína e nem monoleína. Monoleína foi degradada rapidamente e dioleína foi degradada mais que 60% em 1 hora; ambos os substratos foram completamente hidrolisados em 8 horas, enquanto que trioleína teve o grau máximo de hidrólise em torno de 10%. Dentre os diversos tipos de monoglicerídeos testados de C_6 - C_{16} , os ácidos graxos de cadeia média foram rapidamente hidrolisados pela enzima, porém a taxa de hidrólise não foi diretamente

proporcional à quantidade da enzima. O íon cálcio aumentou o grau de hidrólise apenas com relação aos substratos monolaurina e monooleína, mas somente no estágio inicial da reação não afetando a hidrólise de triacilglicerol, ésteres metílicos de ácidos graxos.

BERGLUND et alii, em 1980 (17) separaram monoglicerídeo-lipase de outras lipases como lipase hormônio-sensível, triglicerídeo lipase e de diglicerídeo lipase. A lipase hormônio-sensível que é a enzima chave para regular a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo, tem sido demonstrada ser ativada por proteína-kinase AMP cíclico dependente e reversivelmente desativada por proteína-fosfatase. Tanto em tecido adiposo de rato como de galinha a enzima é obtida na forma de um complexo rico em lipídeos que exhibe quatro atividades que são triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo e colesterol éster hidrolase, estas atividades de acil-hidrolases permanecem interligadas. Os autores utilizaram Triton X-100 para dissociar o complexo lipoproteico da lipase hormônio-sensível, podendo separar a triglicerídeo e diglicerídeo lipase da monoglicerídeo lipase. Durante o processo de purificação o grau de ativação pela proteína kinase diminuiu progressivamente, sendo sugerida a possibilidade de que algumas subunidades ou componentes da lipase que estão intimamente envolvidas na ativação estejam sendo separados da subunidade catalítica.

AKHTAR et alii, em 1980 (2) verificaram a influência de diferentes tipos de triglicerídeos na indução de lipase em Mucor hiemalis. Os triglicerídeos estudados continham principalmente ácido oleico, ácido erúico ou ácidos graxos saturados de 8 a 16 átomos de carbono. A linhagem de Mucor hiemalis estudada produziu lipase extracelular e lipase micelial. Ambas enzimas apresentaram pH ótimo de 7,0. Com a adição de óleo de oliva ao meio fermentativo, a produção de ambas as lipase foi aumentada. Dentre os triglicerídeos estudados o óleo de oliva foi mais efetivo na indução da formação da enzima. A lipase produzida foi mais efetiva contra óleo de côco do que óleo de oliva ou óleo de mostarda. Verificou-se que a lipase produzida por M. hiemalis é induzível e constitutiva.

FIELDING & FIELDING em 1980 (42) relataram as características da hidrólise de triacilglicerol e parcial acilglicerol pela lipoproteína lipase presente no plasma humano. Considerando que a lipoproteína lipase ativada por um único cofator apolipoproteína reage especificamente com os ésteres na posição 1(3) do lipoproteínatriacilglicerol do plasma, o 2-monoacilglicerol produzido poderá ser posteriormente catabolizado pela lipase somente após isomerização, ou poderá ser catabolizado por monoacilglicerol lipase de especificidade adequada, como aquelas presentes nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) ou associadas com as plaquetas do sangue. Os autores verificaram que na presença de alta concentração de apolipoproteína, monoacilglicerol,

diacilglicerol e triacilglicerol são ativados para lipólise pela lipoproteína lipase. Os autores afirmam que a lipase será reativa contra monoacilglicerol somente quando todos os outros acilgliceróis tenham sido removidos do sistema de reação. Portanto, em circunstâncias fisiológicas monoacilglicerol não será um substrato efetivo para lipoproteína lipase mesmo na ausência de outras monoacilglicerol hidrolases, o que levaria a uma quantitativa acumulação de monoacilglicerol a partir da degradação de triacilglicerol pela lipoproteína lipase.

FIELDING em 1981 (41) continuando os trabalhos desenvolvidos neste campo, estudou as propriedades e papel desempenhado pela monoglicerídeo hidrolase na atividade da lipoproteína lipase do plasma e plaquetas de rato, que reagem com os produtos gerados pela ação da lipoproteína lipase. Quando o plasma foi incubado com 1(3)- ou 2-monoleína houve uma significativa degradação destes lipídeos, gerando ácidos graxos livres. Quando o plasma foi fracionado por ultracentrifugação a maior parte da atividade com ambos os isômeros da monoleína foi obtida na fração HDL (High Density Lipoprotein). Em pH 5,5 a maior ação hidrolítica foi com o isômero 1(3)-monoleína. Em pH 8,5 a maior atividade foi contra 2-monoleína. Os reagentes 5,5-dithiobisácido 2-nitrobenzóico ou ácido oleico não diminuíram a atividade da enzima. Quando monoglicerídeo foi gerado pela atividade de lipoproteína lipase utilizando triglicerídeo do quilomicron no leite coronário na ausência de plasma houve um significativo acúmulo de monoglicerídeo, principalmente do 2-monoglicerídeo. Na presença de plasma ou lipoproteína lipase

houve redução substancial tanto de 1-monoglicerídeo como 2-monoglicerídeo. Na presença de lipoproteína de alta densidade (HDL) houve redução de 5 vezes no nível de 2-monoglicerídeo e duas vezes no nível de 1-monoglicerídeo, estes dados ilustram as atividades do plasma na regulação dos níveis de monoglicerídeos, considerando serem estes altamente citotóxicos.

OKUMURA et alii, em 1981 (176) estudaram o efeito da ação reversa da lipase na hidrólise de triglicerídeos. Foram utilizadas as lipases purificadas de Aspergillus niger NRRL-337, Penicillium cyclopium ATCC-34613, Rhizopus delemar ATCC-34612, Geotrichum candidum ATCC-34614. A lipase de R. delemar demonstrou ação mais forte de esterificação durante a hidrólise e no entanto a lipase não hidrolisa ligação éster na posição 2 do glicerídeo. Segundo os autores esta é a causa pela qual o grau de hidrólise desta lipase é o mais baixo dentre as quatro lipases. A lipase de A. niger embora também não hidrolise a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo a hidrólise gradualmente se processa acima de 70%. Isto se deve provavelmente porque a lipase A. niger não é tão ativa na esterificação. A lipase de G. candidum hidrolisa ligações éster em todas as posições do glicerídeo, esta lipase apresentou a mais fraca ação de esterificação durante a hidrólise da trioleína dentre as quatro lipases estudadas. Este dado pode ser a razão porque a lipase de G. candidum hidrolisa a trioleína acima de 90%, mais rapidamente dentre as quatro.

lipases. A lipase de P. cyclopium tem ação de esterificação na hidrólise, similar à lipase de R. delemar.

A hidrólise contínua de triglicerídeos em sistema utilizando solvente orgânico com lipase de Rhizopus arrhizus foi investigada por BELL et alii, em 1981 (15). Foi utilizado o micélio como fonte de lipase imobilizada num reator de leito fixo. A proporção de micélio para a quantidade de substrato foi estabelecido como 1 g de micélio para um fluxo de 1 ml/min. de solução de óleo de oliva 2,5% (p/v), em éter diisopropílico. Tal sistema produziu 45% de ácido graxo a 30°C. A concentração ótima de H₂O foi verificada ser 0,17% (p/v).

TANAKA et alii, em 1981 (236) descreveram a reação de interesterificação enzimática de óleo de oliva em meio de n-hexano, utilizando lipase de Rhizopus delemar. A enzima foi dissolvida em glicerol. Foram testadas várias substâncias para agir como dispersores, porque a solução de lipase em n-hexano não estava dispersa mas presente na forma de gotas. O grau de dispersão da lipase em n-hexano parece afetar a taxa de interesterificação da enzima. Dentre os dispersores estudados areia, celite e carbonato de cálcio mostraram-se mais eficientes.

LAVAYRE & BARATTI, em 1982 (118) prepararam e descreveram as propriedades de lipases imobilizadas. As lipases utilizadas foram lipase pancreática de porco e lipase de Candida cylindracea. O suporte utilizado para imobilização foi vidro poroso "espherosil" derivatizado pela introdução de grupos iodopropila. A natureza da interação lipase-suporte

confirmou-se ser hidrofóbica. As atividades das lipases imobilizadas comparadas às das enzimas solúveis foram dependentes dos substratos. A taxa de hidrólise do substrato sintético paranitrofenilacetato foi aumentada em 23 vezes quando utilizou-se lipase pancreática purificada imobilizada. A mudança conformacional que aumenta a atividade da lipase pode ser resultado da interação da enzima com o suporte hidrofóbico, similar ao que ocorre na interface óleo-água. Quando o substrato tributirina foi utilizado baixa atividade hidrolítica foi observada. Segundo os autores como o substrato forma gotas a baixa atividade poderia ser resultado da resistência estérica à penetração do substrato na matriz porosa.

KOKUSHO et alii, em 1982 (105) isolaram e identificaram microrganismos produtores de lipase alcalina. As linhagens isoladas foram selecionadas baseadas no pH ótimo para atividade na região alcalina, sendo que a atividade da lipase foi estimulada por sais biliares e grande quantidade de monoglicerídeo se acumulava durante a hidrólise de gordura. Os autores consideram que pelas características apresentadas, estes microrganismos pertencem ao gênero *Alcaligenes*.

MACRAE em 1983 (135) relatou a obtenção de misturas de glicerídeos, que não podem ser obtidos por interesterificação química, pelo uso de lipases, considerando-se a sua especificidade. Se lipase não específica é usada para catalisar a interesterificação de uma mistura de triglicerídeo, os triglicerídeos obtidos são similares àqueles obtidos pela interesterificação química. Porém se for utilizado lipase 1,3

específica, a migração acila será confinada às posições 1 e 3. Misturas de triglicerídeos e ácidos graxos livres também podem ser usados como reagentes para a interesterificação. Nestes casos, ácidos graxos livres serão trocados pelos grupos acila do triglicerídeo produzindo novos triglicerídeos enriquecidos com o ácido graxo acrescentado. A habilidade para produzir novas misturas de triglicerídeos usando lipases específicas é de interesse da indústria de óleos e gorduras, porque alguns compostos assim produzidos tem propriedades adequadas a um determinado fim. A interesterificação catalisada por lipase 1,3 específica do triglicerídeo 1,3-dipalmitoil-2-monoleína (POP) que é a fração preponderante do óleo de dendê com ácido esteárico, leva à obtenção de 1(3)-palmitoil-3(1)-estearil-2-monoleína (POS) e 1,3-diestearil-2-monoleína (SOS), que são os dois componentes principais da manteiga de cacau. O autor relata que tem sido possível utilizar a reação de interesterificação para produzir análogo à manteiga de cacau a partir de matéria-prima de baixo custo.

JENSEN et alii, em 1983 (81) descreveram a determinação da especificidade de lipase, relatando que a especificidade de lipases é controlada pela característica molecular da enzima, estrutura do substrato, e fatores que afetam a ligação da enzima ao substrato. Os tipos de especificidade foram descritos quanto: 1) ao substrato quando a lipólise de triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos é feita a diferentes taxas pela mesma enzima; 2) quanto à posição do triglicerídeo, a enzima pode atuar no éster primário, éster

secundário ou não especificar a posição; 3) quanto à preferência pelo ácido graxo; 4) estereoespecificidade: hidrólise mais rápida de éster primário quando comparado com os outros. Todos os tipos de especificidade tem sido detectados com o uso de acilgliceróis sintéticos. A detecção de estereoespecificidade requereu acilglicerol enantiomérico.

ZUBENKO et alii, em 1984 (264) estudaram a taxa de crescimento do fungo Rhizopus microsporum UZLT-1 e a formação de lipase extracelular quando o microrganismo foi cultivado a diferentes temperaturas nas condições empregadas, verificando que o final da fase de crescimento exponencial é um período de intensa formação de esporos pelo fungo, ocorrendo um aumento considerável na biomassa e na atividade lipolítica. O crescimento do fungo e a biossíntese da exolipase dependem da temperatura da cultura. Com aumento da temperatura a duração de todas as fases de crescimento do Rhizopus microsporum é reduzida. A biossíntese de lipase ocorreu em paralelo com o acúmulo da biomassa. A atividade lipolítica permaneceu neste nível até o fim da fase estacionária em todas as temperaturas testadas (28, 38, 48°C). A temperatura ótima para o acúmulo de biomassa e formação de lipase foi 38°C.

LINFIELD et alii, em 1984 (127) estudaram a hidrólise de banha, óleo de côco e óleo de oliva por lipase de Candida rugosa, Aspergillus niger e Rhizopus arrhizus e a esterificação de ácido oleico com glicerol e outros alcoóis na presença de lipases de Candida rugosa e A. niger. A lipólise com lipase de C. rugosa não foi dependente da temperatura na faixa de 26 a

46°C. A banha e o óleo de côco foram lipolisados à mesma taxa enquanto que para óleo de oliva a taxa foi maior. Com relação ao efeito dos íons na atividade enzimática, os autores verificaram o íon sódio não apresentou efeito, porém íon cálcio mostrou ser inibidor. A lipólise com lipase de A. niger foi similar à de C. rugosa, ambas são não específicas, isto é, atacam as posições 1 e 2 do triglicerídeo. A lipase de C. rugosa é sensível ao calor e a inativação da enzima ocorreu a 52°C. Ambas lipases foram capazes de hidrolisar os três substratos completamente em 72 horas. Como a lipase de R. arrhizus é específica para as posições 1,3 do triglicerídeo, ela hidrolisou triglicerídeos mais vagarosamente que a lipase de C. rugosa. A esterificação enzimática embora apresente as vantagens de ocorrer em condições brandas e não envolver a adição de impurezas e reagentes nocivos como haletos de acila, em relação a esterificação química, ocorreu de forma muito lenta. A análise dos produtos de esterificação após 6 semanas de reação mostrou 1,4% monoglicerídeos, 19,8% diglicerídeos e 43,6% triglicerídeos e 35,3% de ácidos graxos, tanto para lipase de A. niger como para lipase de C. rugosa. Ácidos graxos podiam também ser esterificados com vários alcoóis além de glicerol tais como etileno glicol e dietileno glicol.

MEFFERT em 1984 (149) relatou a importância industrial e os usos para ésteres sintetizados de ácidos graxos. Os ésteres de glicerol apresentam cada vez maiores aplicações. Dentre os de uso industrial destacam-se o glicerol monoestearato, o monoleato e monoricinoleato. Os estearato é de

longe o mais importante. Em geral os monoglicerídeos de uso industrial não são puros, consistindo de uma mistura dos seguintes produtos: 40-48% monoéster, 30-40% diéster, 5-10% triéster, 0,2-9% ácido graxo e 4-8% glicerol. As principais aplicações de tais ésteres são como agente emulsificante em cremes, loções, como agente lubrificante na indústria têxtil. Na indústria química é conhecido o papel do monoestearato e monooleato no processamento do cloreto de polivinila (PVC) como lubrificante interno.

ZAKS & KLIBANOV em 1984 (262) estudaram a catálise enzimática em meio orgânico a 100°C, descrevendo as novas propriedades catalíticas de lipase pancreática de porco quando sob desidratação. O meio de reação foi composto com tributirina e heptanol. Os autores consideram que certa mobilidade conformacional é necessária para o desenrolamento da estrutura proteica que é o primeiro passo para o processo de inativação térmica, as enzimas em meio praticamente isento de água poderiam ser mais termoestáveis que as enzimas em meio aquoso. Os testes realizados com a lipase pancreática demonstraram que a enzima isenta de H₂O em meio orgânico foi altamente estável, sua meia vida a 100°C foi maior que 12 horas, enquanto esta lipase em água a 100°C perde quase que instantaneamente a atividade. Com relação a temperatura do sistema de reação a presença de água apresentou efeitos opostos sobre a lipase em meio orgânico a 20 e 100°C. Se água ativou a enzima a 20°C, a

altas temperaturas a lipase foi inativada. Portanto, a desidratação da enzima não somente aumenta a sua estabilidade térmica, mas também altera sua especificidade pelo substrato.

HOQ et alii, em 1984 (61) desenvolveram um bioreator de membrana microporosa para síntese contínua de glicerídeos. A lipase utilizada foi um preparado comercial de Chromobacterium viscosum var. paralipolyticum. Neste sistema a solução de glicerol contendo a lipase e água foi aplicada continuamente de um lado da membrana microporosa de polipropileno e o efluente foi reciclado, enquanto ácido graxo líquido (oleico ou linoleico) era alimentado no lado oposto da membrana e vinha ter contato com a solução de glicerol-água-lipase para causar a reação de esterificação. O produto, glicerídeo era obtido fora, em estado puro. A maior taxa de conversão foi obtida quando o conteúdo de água da solução de glicerol era de 3 a 4%. Quando o acúmulo de água produzida pela reação diminuía o grau de conversão foram colocadas peneiras moleculares na coluna na qual passava a solução de glicerol para manter o nível de água adequado. A reação pode ser realizada no mínimo por um mês, conferindo uma conversão acima de 70% quando foi adicionado 1% de CaCl_2 na solução de glicerol. O principal componente de glicerídeos formados foi quantidade equimolar de mono e diglicerídeos, a quantidade de triglicerídeos foi negligenciável. Os autores verificaram que um aumento na taxa de fluxo do ácido graxo no sistema pode causar decréscimo na

conversão por causa da diminuição do tempo de residência do ácido graxo no bioreator enquanto que à baixas taxas de fluxo a conversão se aproxima do máximo.

LINFIELD et alii, em 1984 (128) utilizaram a lipase produzida por C. rugosa para estabelecer a cinética da lipólise de óleo de oliva, óleo de côco e banha. Esta lipase foi selecionada por ter modo de ação inespecífico o que pode levar à hidrólise completa de substratos variados. A ação enzimática não apresentou mudanças distintas a valores de pH entre 4,8 e 7,2 e os experimentos foram realizados a pH 5,4. A enzima neste pH é estável e possui alta atividade. O óleo de oliva mostrou ser o melhor substrato para hidrólise pela lipase de C. rugosa. Foram utilizadas as temperaturas de 40°C para banha e óleo de oliva e 26°C para óleo de côco. As diferenças nas taxas de hidrólise podem ser relacionadas com a estrutura química dos vários óleos. O grau de insaturação é alto para óleo de oliva (85% de ácido oleico), moderado para banha (40% ácido oleico) e baixo para óleo de côco. Apesar da lipase de C. rugosa ser não específica, ela pode favorecer a hidrólise de lipídeos insaturados.

OKUMURA et alii, em 1984 (173) utilizaram a lipase de A. niger NRRL-337 purificada para sintetizar oligômeros a partir de ácidos dicarboxílicos e alcoóis dihidroxilados, tais como 1,2-etanodiol e 1,3-propanodiol. Os produtos foram analisados por cromatografia em gel e espectro do infra-vermelho. O espectro no infra-vermelho de cada produto exibiu forte absorção entre 1720 cm^{-1} a 1175 cm^{-1} que são

características de ligação éster. Os produtos obtidos foram trimeros, pentâmeros e heptâmeros sintetizados sucessivamente. Após 24 horas de reação quase todo o ácido graxo livre tinha desaparecido foi predominantemente produzido o pentâmero. Após um mês a temperatura ambiente, o pentâmero foi gradualmente reduzido e o heptamero aumentou. Tais produtos, foram praticamente insolúveis em água mas parcialmente solúveis em etanol.

POSORSKE em 1984 (188) descreveu os benefícios industriais da aplicação de lipases para a indústria de óleos e gorduras, descrevendo que há três vantagens oferecidas pelas enzimas em relação aos processos químicos tradicionais usados: especificidade, condições brandas e reduzido desperdício. As aplicações das lipases são descritas como produção de sabor e aroma em queijos, produção de lipolisados de gordura de leite para adicionar em "fast foods". Novas aplicações de lipases com potencial para desenvolvimento pela enzimologia são hidrólise de óleos e gorduras para produção de ácidos graxos, síntese de lipídeos pela reação esterificação e a produção de lipídeos estruturados e novos lipídeos pela reação interesterificação, e como nenhuma destas aplicações é ainda comercial cada possibilidade é foco de intensa investigação.

SEINO et alii, em 1984 (208) sintetizaram ésteres de carboidrato e ácidos graxos por lipase microbiana para superar os inconvenientes da síntese química. Foram testadas as lipases de Rhizopus, Enterobacterium, Aspergillus, Pseudomonas, Chromobacterium, Candida, Mucor, Penicillium. A lipase de C.

rugosa foi a enzima mais ativa na síntese de ésteres de sacarose. Estes ésteres apresentam grande aplicação como agentes emulsificantes em alimentos, cosméticos e medicamentos. Além desta propriedade, alguns podem ser inibidores de crescimento em plantas e agentes anti-tumor. O pH ótimo da mistura de reação para a máxima atividade foi 5,0 a 7,0. A atividade máxima foi observada na concentração da enzima de 4 g/l e pH 5,4. As lipases de Pseudomonas e Enterobacterium também demonstraram atividade para sintetizar ésteres de carboidrato. Mas as atividades não foram tão altas quanto a lipase de Candida. A conversão de ácido oleico foi mais alta quando a concentração de sacarose e ácido oleico foi 0,05 mol/l e 0,2 mol/l respectivamente, após 72 horas de incubação a 40°C com agitação. A taxa de conversão foi maior que 60% para sacarose, frutose e sorbitol e 28% para glicose.

KIM et alii, em 1984 (100) estudaram os efeitos da utilização de solventes orgânicos na estabilidade e atividade na lipase de C. rugosa, na hidrólise de triglicerídeos. Foram testados 5 solventes hidrocarbonetos: n-hexano, n-heptano, n-octano, isooctano, ciclohexano e 3 éteres, éter etílico, éter diisopropílico e éter di-n-butílico. A lipase foi instável em todos os hidrocarbonetos testados exceto em n-octano, e foi estável nos éteres testados. A atividade residual da lipase ficava ao redor de 98% quando a enzima foi incubada a 35°C por 20 minutos independentemente do solvente usado. Quando foram usados hidrocarbonetos ramificados como isooctano e cíclicos como ciclohexano foram obtidos os maiores valores de atividade.

Por outro lado, os éteres apresentaram pouca atividade, apesar de sua estabilidade ser grande. Esta baixa atividade dos éteres pode ser atribuída a inibição competitiva que exercem sobre a enzima.

OKUMURA & KINSELLA em 1985 (101) estudaram a formação de metilcetonas por Penicillium camemberti em sistemas modelo. Os componentes do "flavor" no queijo tipo Camemberti são metilcetona, ácidos graxos, alcoóis, ésteres derivados dos lipídeos, aminoácidos, produtos formados via atividade enzimática do fungo P. camemberti. As metilcetonas são os componentes em maior proporção responsáveis pelo sabor do queijo. Dentre estas 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona são os homólogos em maior proporção. Os autores verificaram que ao se adicionar lipase num sistema de reação composto de leite homogeneizado e diluído com tampão fosfato pH 6,8 e micélio de P. camemberti, a produção de carbonila foi significativamente maior e isto pode ter refletido numa maior concentração de ácidos graxos livres e ácidos graxos de cadeia curta que poderiam ser convertidos em metilcetonas.

HOO et alii, em 1985 (62) descreveram algumas características da síntese contínua de glicerídeos por lipases utilizando um bioreator de membrana hidrofóbica microporosa. Foram utilizadas várias lipases como as de Rhizopus delemar, Pseudomonas fluorescens, Mucor miehei, Chromobacterium viscosum. A lipase de Mucor miehei produziu muito menos triglicerídeos que P. fluorescens, e a lipase P. fluorescens produziu principalmente 1-monoglicerídeo, pequena quantidade de

1,2-diglicerídeo e maior quantidade de 1,3-diglicerídeo do total de diglicerídeo formado, e produziu ainda considerável quantidade de triglicerídeo. Com relação a estabilidade operacional observaram que durante a síntese de glicerídeos nas condições da reação no bioreator a lipase de Mucor miehei foi muito estável num período de uso contínuo de 27 dias.

MUDERHWA et alii, em 1985 (154) purificaram a lipase extracelular de Candida deformans CBS-2071 e estudaram suas propriedades. Esta enzima foi escolhida por ser altamente específica para as posições 1 e 3 do triglicerídeo e assim poderia ser aplicada para hidrolisar óleo de dendê eliminando ácido palmitico que está na posição externa do triglicerídeo. A lipase purificada teve seu peso molecular estimado em 207.000, temperatura ótima de 40 a 50°C e pH ótimo 7,0. Os íons bivalentes Ca^{++} , Mg^{++} e CO^{++} aumentaram a atividade da enzima, enquanto Cu^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} inibiram a enzima fortemente. A inibição da enzima na presença de EDTA indicou que a enzima é dependente de um cofator no seu sítio ativo. Os reagentes ligadores de grupos tiólicos tais como iodoacetamida paracloromercúriobenzoato (PCMB) inibiram a enzima, indicando a presença do grupo SH no sítio ativo da enzima. A hidrólise de óleo de colza e fração sólida do óleo de dendê após 9 horas de incubação produziu 1,2 diglicerídeos e ácidos graxos livres. Não houve acúmulo de 1,3-diglicerídeos. Monoglicerídeos apareceram mais tarde, quando o conteúdo 1,2-diglicerídeo era alto e o de triglicerídeo reduzido. O que confirma sua ação 1,3 específica na molécula do triglicerídeo. Com relação ao grau de

hidrólise, conforme o lipídeo utilizado foi verificado que quanto menor o ácido graxo saturado ou não, maior a taxa de hidrólise. Os triglicerídeos com ácidos graxos monoinsaturados foram mais rapidamente hidrolisados que aqueles com ácidos graxos saturados. Triglicerídeos com C18:2 e C18:3 foram hidrolisados a menores taxas que aqueles C18:0 e C18:1.

LINFIELD et alii, em 1985 (129) dentro do estudo da interação lipídeo-lipase, desenvolveram um método simples e reprodutivo para análise da atividade de lipase. No método desenvolvido foi utilizada agitação ultrassônica e periodicamente repetida, produzindo imediata emulsificação, sem a adição de surfactantes ou emulsificantes. Na lipólise enzimática a maior dificuldade reside na falta de emulsificação entre o substrato lipídico e a água. Os triglicerídeos são notoriamente difíceis de emulsificar sem a ajuda de emulsificantes. Os autores relataram que para os dados de hidrólise enzimática serem reprodutíveis é necessário obter uma boa emulsificação inicial, e que uma vez que a hidrólise tenha começado os monoglicerídeos e diglicerídeos formados agem como agentes emulsificantes internos. Considerando-se que a lipólise enzimática ocorre somente na interface água-óleo, uma boa emulsificação inicial formará uma grande área interfacial e proporcionará dados mais precisos.

HOFELMAN et alii, em 1985 (58) isolaram, purificaram e caracterizaram lipase isoenzimas de uma lipase comercial obtida de A. niger. As enzimas foram isoladas utilizando cromatografia em coluna com diferentes tipos de resina, tendo

sido encontrada duas lipases de diferentes atividades denominadas I e II. Lipase I apresentou peso molecular de 31.000 e lipase II 19.000. O conteúdo de carboidratos nas lipases purificadas I e II foram estimadas em 6 e 9% respectivamente. As enzimas não demonstraram alguma diferença na atividade contra triglicerídeos com ácidos graxos de C_4 e C_{16} . Usando éster nitrofenil de $C_2 - C_{12}$ foram encontradas altas taxas de hidrólise para os ésteres de $C_4 - C_{12}$ pela lipase I. A lipase II predominantemente catalisou a hidrólise de ésteres de ácidos graxos de pequena cadeia. As lipases I e II demonstraram um máximo de atividade entre pH 5,0 e 6,0 e mantiveram a atividade a pH 7,0 e 8,0. Com relação a temperatura, ambas lipases foram estáveis abaixo de 40°C, as atividades foram parcialmente perdidas (40%) após 10 minutos de incubação a 60°C e totalmente destruídas a 80°C. Lipase II foi mais sensível aos íons Hg^{++} e Ag^+ que lipase I. O maior efeito inibitório para a lipase I foi observado com Ag^+ e iodoacetamida.

GOTZ et alii, em 1985 (49) descreveram a sequência completa de nucleolídeos do gen da lipase de Staphylococcus hyicus clonado em Staphylococcus carnosus para obter mais informação sobre a enzima e sua regulação.

A caracterização de lipase de semente de Phaseolus vulgaris foi descrita por KERMASHA et alii, em 1986 (93). A lipase extraída com ajuda de ultrasom e precipitada com sulfato de amônio a 60% apresentou pH ótimo de 7,0. A adição de cálcio ao sistema de reação inibiu a atividade enzimática.

Para verificar se esta lipase era uma lipase verdadeira ou se poderia ser caracterizada como carboxilesterase, a atividade da enzima foi analisada com três substratos: triacetina, óleo de oliva e lipídeo extraído do próprio feijão. A enzima mostrou grande afinidade pela triacetina em relação ao óleo de oliva e ao lipídeo do feijão, indicando substancial atividade de carboxilesterase, quando comparada com a lipase pancreática pura. A lipase pancreática apresentou 6 vezes menos atividade sobre triacetina e duas vezes menos atividade sobre óleo de oliva e lipídeos do feijão.

KWON & RHEE em 1986 (115) descreveram um método simplificado para determinação de ácidos graxos livres, para medir atividade de lipases. Este método utilizava a adição de isoctano e HCl 6N para paralisar a reação. A camada contendo ácidos graxos livres e o solvente é transferida para tubo de ensaio acrescentando-se 1 ml do reagente acetato cúprico-piridina, a mistura é homogeneizada vigorosamente por 90 segundos e quando as fases se sedimentam, mede-se a absorbância da fase orgânica a 715 nm. Segundo os autores os resultados indicam que este método foi melhor que o método de emulsão de óleo/H₂O sendo muito simples e rápido e aplicável para determinação da atividade lipolítica.

MUDERHWA et alii, em 1986 (155) purificaram a lipase de Rhodotorula pilimanae Hedrick e Burke e descreveram suas propriedades. Esta linhagem secretou duas lipases extracelulares, com pH ótimo de 4,0 e 7,0, denominadas lipase I e lipase II. Lipase I apresentou peso molecular de 176.800 e

lipase II 21.400. A temperatura ótima de atividade esteve na faixa de 45 a 50°C para ambas lipases. EDTA não afetou a atividade enzimática indicando que as duas lipases não são dependentes de cofator metálico no sítio catalítico. Com relação a especificidade, foi utilizado o óleo de colza como substrato para as lipases, por um período de 8 horas, sendo obtidos os produtos 1,2-diglicerídeos e ácidos graxos livres. Não houve nenhuma formação ou acúmulo de 1,3-diglicerídeos. Estes resultados indicaram que estas lipases foram específicas para a posição primária do triglicerídeo.

ARBIGE et alii, em 1986 (7) relataram a descoberta de uma nova lipase para desenvolvimento de aroma e sabor de queijo tipo "Cheddar". Como a maturação deste queijo para desenvolver as características de aroma e sabor e corpo desejados leva de 3 a 9 meses, tem havido grande interesse em processos que visem a aceleração da maturação, o que possibilitaria grande economia a indústria queijeira. A enzima estudada foi produzida por Aspergillus oryzae, sendo esta linhagem selecionada por produzir um típico aroma "Cheddar" quando incubado em gordura de leite por 15 dias a temperatura de 4°C. Esta lipase hidrolisou triglicerídeos compostos de ácidos graxos de C₄ a C₁₈ átomos de carbono. Esta característica foi de grande importância, pois a grande maioria das lipases estudadas libera preferencialmente ácido butírico (C₄) produzindo um odor característico de ranço ou libera ácidos graxos de cadeia C₁₂ ou maiores, produzindo aroma e sabor de "sabão". Os ácidos graxos liberados pela lipase de Aspergillus oryzae são quase

idênticos aos ácidos graxos liberados durante a maturação natural do queijo "Cheddar". Os autores relatam que quando esta enzima é usada em conjunto com certa protease fúngica em concentração otimizada produzido aroma e sabor de queijo "Cheddar" de alta qualidade.

ODERA et alii, em 1986 (170) criaram uma linhagem hiperprodutora de um tipo particular de lipase através de clonagem dos genes de lipase e então inseriram os mesmos num hospedeiro apropriado. Neste estudo foram isolados microrganismos de amostras de solo e selecionados pela sua habilidade de produzir lipase e crescer a 42°C. Todas as linhagens isoladas produziram lipase extracelular. As linhagens foram selecionadas de Alcaligenes denitrificans e duas de Pseudomonas aeruginosa. Os genes de lipases de tais linhagens foram clonados em Escherichia coli JH3. A produção de lipase foi aumentada pelo simples experimento de clonagem, e a atividade lipolítica foi 20 vezes mais alta que a linhagens de Alcaligenes denitrificans.

KHOR, TAN & CHUA em 1986 (97) estudaram a hidrólise de óleo de dendê por lipase de Candida rugosa, utilizando solubilização do óleo de dendê que é semi sólido à temperatura ambiente, em hexano. Foi encontrado que a proporção ótima de hexano para óleo é de 0,5 ml de hexano para 1 g de óleo. A temperatura ótima foi de 37°C e pH ótimo 7,5. O efeito inibitório do íon cálcio na lipólise aumentou com o aumento da concentração do íon. A hidrólise completa do substrato foi realizada após 5 horas de incubação. A taxa de hidrólise foi

linear na escala logarítmica. A análise dos produtos de hidrólise por cromatografia em camada delgada (TLC) demonstrou que após 6 horas, todo triglicerídeo foi convertido em ácidos graxos e glicerol.

FUJII et alii, em 1986 (44) relataram o efeito da lipase de Candida rugosa na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão, visando a aplicação de lipases em detergentes para lavanderia. Foi verificado que a remoção do óleo aumentou quando a concentração de lipase aumentou, na presença de agentes tensoativos. A temperatura mais adequada da água de lavagem foi 37°C que é a temperatura ótima desta lipase. Com relação ao tipo de agente tensoativo, a lipase foi mais efetiva com os não iônicos, porque a atividade da lipase é menos inibida pelos não iônicos que pelos iônicos. Os dados obtidos comprovam que a lipase de Candida rugosa aumenta a remoção de óleo de oliva do tecido de algodão em cerca de 15 a 20% à temperatura de 37°C, podendo ser utilizada em detergentes para lavanderia.

GOMI et alii, em 1986 (48) descreveram o procedimento para isolamento, determinação da estrutura e estudaram algumas características de ativadores de lipase de Saccharomycopsis lipolytica. Este estudo foi motivado pela observação que algumas lipases requerem ativadores para hidrólise de triglicerídeos, tais como sais biliares e colipase para lipase pancreática, adrenalina para a lipase hormônio-sensível do tecido adiposo etc. Foram isolados 3 tipos de ativadores de lipases no meio de cultivo de Saccharomycopsis lipolytica.

denominados α , β , γ . O ativador γ foi o mais ativo para a reação de lipase de S. lipolytica. O ativador β foi identificado como uma mistura de ácido 3,5-dihidroxi-7-tetradecenóico e compostos relacionados pelo método da Ressonância Nuclear Magnética (NMR). Os autores relatam que o grupo carboxílico livre nos compostos foi essencial para ativação da lipase.

KODERA et alii, em 1986 (104) modificaram a lipase de Candida cylindracea (rugosa) e verificaram a síntese de ésteres de alcoóis de cadeia curta e ácidos carboxílicos α -substituídos em benzeno. A modificação da lipase foi realizada pela mistura da lipase com polietilenoglicol e incubação por 15 minutos a 25°C, sob agitação branda. Esta lipase que teve 47% do seu total de grupos amina modificados, reteve 56% da atividade hidrolítica original, sendo solúvel e ativa em solventes orgânicos como o benzeno, tolueno, clorofórmio e 1,1,1, tricloroetano. A mais alta atividade de síntese da lipase modificada foi obtida com alcoóis de cadeia curta ($C_1 - C_6$) e ácidos graxos com cadeia curta C_4 ou longa C_{12} .

NISHIO et alii, em 1987 (166) purificaram a lipase produzida por Pseudomonas fragi 2239B e estudaram algumas propriedades da enzima. A enzima purificada apresentou peso molecular de 33.000, ponto isoelétrico de 6,9. A enzima foi mais ativa a pH 9,0 e foi estável numa faixa de pH de 6,5 a 10,5 a 30°C e de 8,0 a 10,5 a 50°C após 24 horas de incubação, sendo portanto estável em solução alcalina. A lipase de Pseudomonas fragi foi estável a temperaturas abaixo de 50°C a

pH 9,0 por 24 horas, tendo excelente termoestabilidade até 51°C. Os íons Zn^{++} , Fe^{++} e Fe^{+++} inibiram fortemente a atividade enzimática.

WINGENDER et alii, em 1987 (256) estudaram a interação de lipase extracelular de Pseudomonas com alginato e seu uso potencial em biotecnologia. A adição de alginato à suspensão de células de P. aeruginosa causou um forte e imediato aumento na atividade da exolipase. Esta observação foi explicada pelas interações entre o polissacarídeo e a lipase ligada à célula, resultando em liberação da enzima para o meio de cultivo. Os resultados dos experimentos realizados "in vitro" confirmaram a interação entre alginato e a lipase, tais como: a adsorção da exolipase à esferas de vidro foi fortemente reduzida por tratamento da enzima com alginato; o alginato aumentou a estabilidade da exolipase ao calor e ao ácido. Os autores consideram que talvez a exolipase de Pseudomonas se assemelhe a lipoproteína lipase de mamíferos, possuindo possivelmente sítios de ligação independentes para moléculas do substrato, interfaces óleo-água, poliânions e detergentes.

TAHOUN et alii, em 1987 (234) purificaram uma lipase intracelular produzida por Aspergillus niger CBS-11080 e estudaram a hidrólise de triglicerídeos sintéticos e naturais por esta enzima. Esta lipase demonstrou atividade máxima sobre tripalmitoilglicerol e a mais baixa atividade contra trioleoilglicerol atacando as posições 1 e 3 dos triglicerídeos, sendo portanto, específica para estas posições, o que se assemelha à especificidade da lipase extracelular de A. niger.

JENSEN et alii, em 1987 (77) estudaram a purificação parcial e a caracterização de lipases de Mucor miehei. A lipase extracelular, uma glicoproteína, produzida pelo microrganismo foi purificada parcialmente em duas formas A e B. Ambas apresentaram pH ótimo de 7,0 com o substrato tributirilglicerol. A lipase B foi formada pela deglicosilação parcial da lipase A. As duas enzimas foram imobilizadas por adsorção em resina Duolite e tanto as enzimas solúveis como as imobilizadas foram altamente específicas para a posição primária na ligação éster do triglicerídeo. Os triglicerídeos de 12:0, 14:0, 16:0, 18:0 foram hidrolisados mais rapidamente que os compostos de 4:0, 6:0, 8:0 e 10:0, com a imobilização a especificidade foi alterada sendo a hidrólise ligeiramente maior para triglicerídeos 14:0 e 16:0.

NAIR & BONE em 1987 (161) estudaram as condições ótimas para produção de lipases de Aspergillus foetidus em meio líquido e a imobilização do microrganismo em polímeros naturais como alginato de sódio e agar para produção de lipase. O óleo de oliva na concentração de 2% e sacarose 0,5% no meio de cultivo aumentou a produção de lipase. A velocidade de agitação foi estudada nos valores de 250, 500 e 700 rpm, sendo obtida atividade enzimática máxima a 500 rpm. O pH cai no início da fermentação de 4,5 para 2,5. A queda no pH foi seguida pela produção da enzima. A imobilização realizada não obteve sucesso, pois houve desintegração do alginato e do agar e

baixos níveis de lipase foram produzidas. Aparentemente A. foetidus consome estes polissacarídeos como fonte de nutrição para seu crescimento.

NISHIO et alii, em 1987 (167) estudaram a especificidade de substrato e o modo de ação da lipase de Pseudomonas fragi 2239B. Foram testados vários ésteres de ácidos graxos na presença e na ausência de íons cálcio. A lipase hidrolisou não somente triglicerídeos mas também ésteres sintéticos como metiloleato e Tween. A adição de cálcio para a mistura de reação promoveu a hidrólise de tais substratos. O efeito do tamanho da cadeia do ácido graxo na hidrólise de triglicerídeos saturados foi estudado sendo obtido que triglicerídeos de cadeia curta foram hidrolisados mais rapidamente, cerca de 3,2 vezes mais rápido que trioléina na presença de íons cálcio. A adição de Ca^{++} para a mistura de reação não afetou a taxa de hidrólise para triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia média ou curta como C_4 , C_6 , C_8 , C_{10} , C_{12} , mas afetou a taxa de hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa C_{14} , C_{16} e C_{18} . A análise dos produtos de hidrólise da trioléina por cromatografia em camada delgada (TLC) indicou que a lipase de P. fragi tem especificidade para as posições 1,3 do triglicerídeo.

SZTAJER & MALISZEWSKA em 1988 (233) descreveram o isolamento de microrganismos produtores de exolipases. Dos 160 microrganismos selecionados pela atividade lipolítica apresentada 3 linhagens destacaram-se como altamente produtoras: Streptomyces sp., Bacillus sp., e Pseudomonas

fluorescens. O óleo de oliva e tributirina foram as melhores fontes de carbono para as linhagens enquanto óleo de soja e óleo de colza inibiram o crescimento dos microrganismos.

ISOBE et alii, em 1988 (67) purificaram, cristalizaram e determinaram algumas propriedades de uma nova lipase de Penicillium cyclopium M1. A nova lipase foi claramente distinta das outras duas denominadas lipase I e lipase II já descritas na literatura. Sua separação das demais foi realizada em cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose. Os triglicerídeos trioleína, tricaprina e tricaprilina foram efetivamente hidrolisados pela lipase II. Trimiristina, tripalmitina, trilaurina, tricaproína e tributirina foram também hidrolisados pela lipase II, porém em taxas menores que a trioleína. O peso molecular foi 110.000, provavelmente contendo duas subunidades de mesmo peso molecular. O pH ótimo da enzima foi ao redor de 6,0 e a temperatura ótima encontrada foi 40°C. A enzima foi estável na faixa de pH entre 4,5 e 6,0, após incubação a 37°C por 30 minutos. As lipases I e II hidrolisaram fracamente os triglicerídeos presentes no soro humano, presença ou ausência de Triton X-100. A lipase III também hidrolisou pouco os triglicerídeos presentes no soro humano, na ausência de Triton X-100. A enzima também hidrolisou rapidamente o substrato sintético para-nitrofenyllaurato. A lipase III hidrolisou as três posições no triglicerídeo. Como a lipase III age na presença de agentes tensoativos os autores sugerem sua utilização nas análises laboratoriais de dosagem de

triglicerídeos que são feitas em alta concentração de agentes tensoativos para dissolver os quilomicrons no soro, quando são analisados.

PARK et alii, em 1988 (183) utilizaram um sistema combinado de lipases para hidrólise de óleo de soja. A hidrólise de óleo de soja por diferentes lipases foi comparada e foi verificado que lipase de Rhizopus delemar (D), lipase de Rhizopus niveus (N) e lipase de Penicillium (G) hidrolisaram óleo de soja nas porcentagens 44, 42 e 7,2% respectivamente, após 10 horas de reação, o que representou hidrólise incompleta. Porém quando foi utilizado um sistema de enzimas combinadas (lipase G + lipase N) e lipases (G + D) o grau de hidrólise do óleo de soja estendeu-se para 95-98% após 10 horas de reação. Tendo sido plotada a porcentagem de hidrólise do óleo de soja, com o sistema combinado, contra o logarítmico do tempo de reação resultou em correlação linear.

NAHAS em 1988 (160) investigou o controle da produção de lipases por Rhizopus oligosporus sob várias condições de crescimento. Os carboidratos foram boa fonte de carbono para o crescimento do R. oligosporus, mas pouca produção de lipase foi obtida. O efeito dos carboidratos foram testados utilizando-se meio de cultura suplementado com farelo de soja e concentrações crescentes de glicose. A produção de lipase foi facilmente reprimida pelas altas concentrações de glicose. Com a adição de "Tweens" ao meio de cultura houve aumento considerável da produção de lipase.

DAVRANOV et alii, em 1988 (29) produziram lipase imobilizada por adsorção em DEAE-celulose e estudaram suas propriedades. A lipase obtida de Rhizopus microsporus foi imobilizada em coluna de DEAE-celulose à temperatura de 18°C tendo sido verificado que o tempo de contato entre a lipase e o adsorvente foi um fator importante para o sucesso da adsorção. A lipase fortemente ligada foi cataliticamente ativa e podia decompor tributirina e óleo de algodão. O pH ótimo da enzima imobilizada e da enzima nativa foi o mesmo, entretanto a enzima imobilizada tinha menor atividade que a enzima nativa, cêrca de 40% da sua atividade. A faixa de temperatura ótima para a enzima imobilizada foi 45-87°C, porém a enzima nativa foi inativada nesta faixa de temperatura. Os autores consideram que a imobilização levou a estabilização da enzima.

NAKASHIMA et alii, em 1988 (162) estudaram as condições de cultivo para a produção de lipase intracelular de Rhizopus chinensis em suspensão de células e células imobilizadas em partículas cúbicas de espuma de poliuretano (Biomass support particles, BSP). A lipase de R. chinensis é específica para a posição 1,3 do triglicerídeo e o microrganismo foi cultivado em meio líquido como suspensão de células e como células imobilizadas em espuma de poliuretano. As células livres e imobilizadas foram secas em acetona e foram utilizadas para interesterificação da mistura de óleo de oliva e metilestearato dissolvido em hexano. A reação de hidrólise foi feita num sistema contendo óleo de oliva. A presença de glucose em grande concentração no meio de cultura reduziu a

produção de lipase. Os compostos relacionados aos substratos foram utilizados com indutores no meio de cultura, dentre estes óleo de oliva e ácido oleico aumentaram grandemente a produção de lipase. As células imobilizadas em BSP foram firmemente ligadas à matriz da membrana. A atividade de interesterificação da célula imobilizada foi aumentada de 4 a 7 vezes em relação as células livres, no entanto, a hidrólise realizada no intracelular não foi tão intensa nas células imobilizadas.

KANG & RHEE em 1988 (89) verificaram o efeito da água na hidrólise de óleo de oliva por lipase de Candida rugosa imobilizada num sistema de fase reversa. A enzima foi imobilizada em Sephadex LH-20 e Sephadex LH-60. Como o conteúdo de água em Sephadex LH-20 foi aumentado de 9% para 66%, a taxa de hidrólise foi aumentada e o grau de hidrólise foi aumentado de 8 para 90% após 40 horas de reação. Sephadex LH-20 apresentou a propriedade de se ligar predominantemente ao componente polar, que é a água, o que causou o aumento da quantidade de água disponível.

WANG et alii, em 1988 (254) investigaram a cinética da hidrólise de óleo de oliva por lipase de Candida rugosa na ausência de emulsificante. A substituição de emulsificante por agitação mecânica da ordem de 1100 rpm resultou em 25% de hidrólise de óleo de oliva pela lipase de Candida dentro de 30 minutos de reação. Com relação ao pH ótimo, foram obtidos diferentes dados de acordo com o substrato usado. Com tributirina o pH ótimo foi 7,0 e com óleo de oliva 5,0. O íon

cálcio aparentemente aumentou a taxa de hidrólise do óleo de oliva tanto a pH 5,0 como pH 7,0, sendo que o efeito a pH 7,0 foi mais proeminente que pH 5,0.

HUANG et alii, em 1988 (63) descreveram as características de lipases de milho e colza, observando que lipases de certas espécies vegetais são relativamente específicas para os triglicerídeos que estão presentes no próprio vegetal. As lipases de milho e colza foram mais ativas contra trioleína do que contra di ou monoleína. A lipase de milho demonstrou algum grau de preferência na hidrólise de ácidos graxos da posição primária do triglicerídeo, nesta posição a lipase é mais ativa contra o éster de oleil do que estearil. Com relação a biossíntese de lipase na semente de milho foi verificado que a lipase começa aparecer dois dias após a embebição da semente, concomitantemente com o decréscimo do teor dos lipídeos totais. A atividade encontra o valor máximo cerca de 5 a 6 dias, permanecendo inalterada 5 a 10 dias, e aparentemente a lipase está sendo constantemente sintetizada.

TAKAHASHI et alii, em 1988 (235) modificaram lipase de Pseudomonas fluorescens por tratamento com polietilenoglicol (PEG), através de ligação covalente, causando alterações físico-químicas na enzima sem mudar sua conformação. Esta lipase modificada tinha cerca de 80% da atividade original da lipase e não continha lipase original como contaminante, sendo rapidamente solúvel em solventes orgânicos como benzeno, tolueno, clorofórmio e 1,1,1-tricloroetano, catalisando reações

nestes solventes. A síntese de ésteres em solvente orgânico (benzeno) aumentou linearmente com o aumento da concentração da enzima modificada. Como as reações foram conduzidas num sistema homogêneo, foi possível estudar a cinética para a especificidade do substrato. A velocidade máxima foi aumentada com o aumento da cadeia de carbono do ácido graxo ou do álcool utilizado na esterificação mas o K_m (constante de Michaelis e Menten) foi duramente afetado. A lipase modificada também catalisou eficientemente a reação de interesterificação entre trilaurina e trioleína sem algum solvente, após 65 horas de incubação aproximadamente 30% dos substratos foram transformados em produtos. A temperatura de fusão da mistura foi abaixada de 33-36°C para 11-13°C, devido à troca de ácidos graxos entre os dois glicerídeos trilaurina e trioleína. Os autores descrevem uma aplicação prática da lipase modificada na síntese de ésteres de retinil. Tais ésteres são mais estáveis que o retinol, retinal e ácido retinóico, as várias formas da vitamina A. Ésteres de retinil com longa cadeia de ácido graxo são produzidos por síntese orgânica que utiliza alta temperatura dando alto valor de peróxido e sendo muito instáveis. Os autores obtiveram sucesso na síntese de palmital de retinil e retinil oleato usando esta lipase em meio com benzeno, apresentando a vantagem de usar condições brandas, com baixo valor de formação de peróxido.

BAILLARGEON & SONNET em 1988 (10) obtiveram a lipase modificada de Candida rugosa com polietilenoglicol através de ligação covalente. As propriedades da enzima modificada foram

comparadas com a lipase de Candida rugosa original. A lipase modificada é dez vezes mais estável que a lipase original em água, mas menos estável em benzeno. A modificação alterou a seletividade favorecendo mais a reação de síntese com ácido oleico do que com ácido esteárico.

JACOBSEN et alii, em 1989 (73) produziram e caracterizaram múltiplas formas de lipases produzidas por Geotrichum candidum. A produção máxima de lipase extracelular foi encontrada após 27 horas de incubação. Com a utilização de técnicas de imunoeletroforese foi verificado um alto grau de heterogeneidade das lipases extracelulares produzidas por G. candidum, o que indica múltiplas formas de enzimas.

TAYLOR em 1989 (237) realizou a estabilização de lipase de Thermomyces lanuginosus (anteriormente chamada Humicola) com ácido p-cloromercúrio benzóico (PCMB), visando aumentar a produção de lipase e sua termoestabilidade. A adição de PCMB levou a estabilização da lipase porque ocorreu inativação de protease sulfidrílica na preparação da lipase. Os autores descrevem que apesar de tão importante efeito o PCMB é muito tóxico para utilização em fermentação em escala industrial.

NAGAO & KITE em 1989 (157) desenvolveram um novo tipo de emulsificante formado pela reação entre um aminoácido e um ácido graxo ou ácidos graxos a partir de triglicerídeos. Foi utilizado ácido oleico e L-Homoserina na presença de lipase de Candida cylindracea (Candida rugosa). O produto (óleo L-homoserina) foi purificado em coluna de ácido silícico e

apresentava quantidades equimolares de ácido oleico e L-Homoserina e a ligação entre eles foi considerada ser uma ligação éster devido a sua susceptibilidade à metanólise, apresentando forte absorção a 1730 e 1170 cm^{-1} no espectro do infravermelho. Para verificar se outras lipases teriam a mesma ação catalítica, foi testada a lipase de Rhizopus delemar nas mesmas condições. A quantidade de produto formado foi cerca de 17,9% da formada usando lipase de C. cylindracea. O pH ótimo ficou na faixa de 7,5 a 8,0. Após 12 horas de reação foi encontrado o equilíbrio no sistema de reação, tendo sido aumentada apenas quando a concentração de L-homoserina aumentou. Foram testados vários aminoácidos hidroxilados, tais como L-serina, L-treonina e L-tirosina. A L-homoserina foi o mais efetivo substrato dentre os testados. Foram testados óleos vegetais e ácidos graxos insaturados. Os ácidos graxos sólidos à temperatura de reação como o ácido palmítico e esteárico não foram efetivos. A reatividade de ácido palmítico e esteárico aumentou quando foi adicionado n-hexano à mistura. A atividade emulsificante foi mais elevada que os agentes tensoativos convencionais e caseína.

VEERARAGAVAN & GIBBS em 1989 (251) relataram a presença de dois tipos de lipases na lipase comercial de Candida rugosa. As lipases apresentaram atividades específicas de 145 e 378 $\mu\text{mol}/\text{min.}/\text{mg}$ de proteína. O peso molecular foi estimado em 58.000 para cada uma delas. Os pontos isoeletricos da lipase I e lipase II foram 5,6 e 5,8 respectivamente.

PIAZZA et alii, em 1989 (187) obtiveram lipase de semente de aveia (Avena sativa L.) e testaram sua utilização na hidrólise de óleo de oliva e banha. A enzima só foi ativa na hidrólise de óleo de oliva na presença de CaCl_2 na concentração de 40 mM ou mais alta, à temperatura ambiente. Outros sais foram testados, tais como KCl, NaCl, MgCl_2 , CaCl_2 , ZnCl_2 , FeCl_3 os quais não estimularam atividade lipolítica. Na lipólise de banha, esta foi fundida a 46°C sendo necessário a adição de CaCl_2 . O aumento da concentração de CaCl_2 aumentava a hidrólise da banha, até a concentração de 45 mM. A lipase de aveia agiu seletivamente sobre ácido oleico, não atuando sobre glicerídeos saturados.

SZTAJER & MALISZEWSKA em 1989 (232) estudaram o efeito das condições de cultivo na atividade lipolítica de Penicillium citrinum. Dentre as fontes de carbono estudadas a maior produtividade de enzima lipolítica no período de incubação de 168 horas, foi obtida quando amido foi usado como fonte de carbono. Com relação a fonte de nitrogênio e a atividade lipolítica, peptona a 5% foi o agente mais efetivo para a produtividade, uréia e sulfato de amônio não estimularam a produção de lipase. O pH ótimo para produção de lipase foi 7,2, temperaturas baixas de incubação de 22 a 28°C tiveram um efeito estimulatório na produtividade lipolítica desta linhagem.

MARTY et alii, em 1990 (139) compararam a reação de esterificação catalisada por lipase em dióxido de carbono supercrítico e em n-hexano, como solventes. Foi escolhido um

sistema de reação como modelo composto de ácido oleico e etanol produzindo oleato de etila e água, com lipase comercial de Mucor miehei imobilizada em resina aniônica. Com relação à estabilidade a enzima apresentou perda de atividade de 10% após 6 dias tanto para n-hexano como para CO₂ supercrítico a 40°C. Numa concentração de ácido oleico de 8mM, ocorreram efeitos inibitórios mais fortes em n-hexano.

SVENSSON et alii, em 1990 (212) estudaram a interesterificação de fosfatidilcolina com lipases em meio orgânico visando a modificação por interesterificação de fosfatidilcolina. Foram testadas várias lipases para catalisar a reação de interesterificação entre fosfatidilcolina de ovo e ácido heptadecanóico em tolueno. A melhor conversão foi obtida com a lipase comercial de Mucor miehei. Após 48 horas de reação a quantidade total de fosfatidilcolina diminuiu cerca de 40% da quantidade original. A quantidade de ácido heptadecanóico incorporado na fosfatidilcolina devido à interesterificação foi cerca de 30% após 48 horas de incubação. A lipase utilizada foi seletiva para a posição Sn-1 da fosfatidilcolina.

ESPINOSA et alii, em 1990 (40) verificaram os efeitos de alguns nutrientes que afetam a produção de lipase de Rhizopus delemar CDBB H-313. Foram testados diferentes carboidratos como fontes de carbono, tendo sido encontrado que na presença de dextrina a produção de lipase foi 1,6 vezes maior que com glucose. Diferentes óleos foram utilizados como única fonte de carbono sendo que o tipo de óleo utilizado mostrou ser importante tanto para a produção de lipase como

para o crescimento do fungo. O óleo de girassol foi o que produziu maior quantidade de lipase. A adição de Tween 80 exerceu um duplo efeito, podendo agir como um indutor pois sua natureza química é similar à de alguns substratos, mas é também um agente tensoativo, sua presença estimulou a liberação da enzima, aumentando a atividade lipolítica em cerca de duas vezes.

PETROVIC et alii, em 1990 (186) testaram o efeito da adição de vários tipos de fonte de carbono no meio de crescimento na produção de lipase extracelular de Penicillium roqueforti S-86. A maior quantidade de enzima foi secretada no sexto dia de incubação a 27°C. A maior atividade foi obtida no meio com glicose e com frutose. Na presença de gordura de manteiga os valores de atividade foram cem vezes menores do que com glicose, e não foi detectada nenhuma atividade quando óleo de oliva foi usado como fonte de carbono. A temperatura ótima de atividade foi 30°C e pH ótimo 8,0. Os sais de potássio e sódio indicaram efeitos positivos na concentração até 1 mmol/l. Dos cátions bivalentes testados ocorreu ativação com os íons Mn^{++} na concentração de 10 mmol/l e Ca^{++} 1 mmol/l, porém Mg^{++} diminui a atividade enzimática. O efeito mais negativo sobre atividade foi encontrado na presença de sais de Fe^{+++} .

BLOOMER et alii, em 1990 (22) estudaram a interesterificação de triglicerídeos por diferentes lipases para produção de análogo de manteiga de cacau. O sistema de reação foi composto de óleo de dendê e etil estearato dissolvidos em n-heptano, incubados a 40°C por 30 minutos.

Foram testados enzimas comerciais imobilizadas em celite. A influência da concentração do solvente n-heptano na taxa de reação e a pureza do produto foi examinado a duas temperaturas. A concentração ótima do solvente a 40°C foi de 1-1,5 g de solvente/grama de substrato; a 60°C a taxa de interesterificação diminuía e a pureza do produto diminuía com o aumento da quantidade do solvente. Com relação aos tipos de suporte para imobilização e as formas de substrato foi verificado que nenhuma enzima apresentou atividade máxima em todos os suportes e nenhum suporte produziu preparação enzimática de alta atividade.

SERVAT et alii, em 1990 (210) realizaram síntese biotecnológica de uma nova classe de moléculas anfifílicas, ácidos graxos hidroxiâmicos usando lipase de Mucor miehei, reagindo hidroxil amins com ácidos graxos na forma de éster metilado ou livre. O sistema de reação foi formado por ésteres metílicos de óleo de soja, hidroxilamina ou ácido oleico hidroxilamina. A utilização de ácido graxo livre foi de maior eficiência e foi utilizado para o estudo das condições de otimização. Foram utilizado dois diluentes, tampão fosfato pH 7,0 50 mM e hexano. A síntese de ácido oleilhidroxiâmico foi mais substancial em todas as temperaturas testadas, numa escala de 25 a 70°C em tampão fosfato. Para verificar a possibilidade de utilizar este sistema de reação para outros ácidos graxos foram testados ácido caprílico, cáprico, palmítico, esteárico, oleico, erúcico e linoleico. Em todos os casos, os dados foram

semelhantes ao obtidos com ácido oleico, podendo ser aplicado para a maioria dos ácidos graxos, saturados, monoinsaturados, polinsaturados, com átomos de carbono de 8 a 22.

OKEKE & OKOLO em 1990 (171) descreveram o efeito das condições de cultura na produção de lipase por Acromonium strictum. As condições ótimas de cultivo para a produção desta lipase foram: período de incubação de 7 dias a 30°C, em cultura estacionária, na presença de xilose a 2% e farelo de soja a 3,5%, como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente. A incorporação de 1% de Tween 80 no meio de cultura aumentou a produção da enzima enquanto que a presença de ácidos graxos reduziu tanto o crescimento do fungo como a produção de lipase. A lipase de A. strictum demonstrou ampla especificidade de substrato hidrolisando tanto compostos Tweens solúveis como lipídeos insolúveis.

JANSEN et alii, em 1990 (76) descreveram a síntese enzimática de ésteres de carboidrato em meio aquoso, utilizando lipase de Candida rugosa, visando a utilização destes ésteres como agentes tensoativos em alimentos, na indústria de cosméticos e detergentes. Neste processo foi utilizado um sistema de duas fases consistindo de solução carboidratos saturada e fase orgânica de ácidos graxos. A reação foi realizada a 35°C com agitação de 500 rpm. A taxa de esterificação utilizando ácido decanóico e sorbitol foi de 3,0 mmol/g/hora e foi fortemente dependente do conteúdo de água na mistura de reação.

McNEILL et alii, em 1990 (146) obtiveram grande produção de monoglicerídeo através da glicerólise enzimática de banha de boi. Foram testadas lipases comerciais de Pseudomonas fluorescens, Chromobacterium viscosum, Rhizopus japonicus, Mucor miehei SP-398 e Candida cylindracea. A relação entre produção de monoglicerídeo e temperatura demonstrou que acima de 46°C aproximadamente 30% de monoglicerídeo foi obtido no equilíbrio. A 46°C ou temperatura mais baixa aproximadamente 70% de monoglicerídeo foi produzido. Após 3 horas a 46°C ou à temperatura mais baixa, a mistura de reação se tornou sólida e agitação se tornou impossível. A composição da mistura de glicerídeos a 42°C durante a glicerólise da banha demonstrou que inicialmente havia um decréscimo linear na concentração do triglicerídeo e um aumento linear na concentração de 1,3-diglicerídeo, 1,2-diglicerídeo e monoglicerídeo. Após 2 a 3 horas a concentração de 1,3- e 1,2-diglicerídeo começou a diminuir enquanto que a concentração de monoglicerídeo continuou a aumentar linearmente. Após 28 horas de incubação a concentração de monoglicerídeo foi de 71,3%. Quando o teor de água do sistema de reação foi acima de 8,5% a produção de monoglicerídeo foi reduzida. De todas as enzimas testadas a maior concentração de monoglicerídeo foi obtida com a lipase de Chromobacterium viscosum e Pseudomonas fluorescens. Mucor miehei foi parcialmente efetiva, enquanto Candida cylindracea foi inativa.

OSADA et alii, em 1990 (178) estudaram síntese de glicerídeos compostos de ácidos graxos polinsaturados por lipases microbianas. Foram utilizados ácidos graxos polinsaturados de 18 e 20 átomos de carbono. A lipase de C. viscosum incorporou cada um dos ácidos graxos no glicerol a níveis maiores que 89%. A lipase de C. cylindracea incorporou a maioria dos ácidos graxos a níveis de 70%.

BAILLARGEON em 1990 (9) purificou e descreveu a especificidade de lipases de Gegtrichum candidum a partir de um preparado bruto comercial de enzima. Foram isoladas duas enzimas denominadas lipase A e lipase B. A lipase A continha 11,4% de carboidrato, esta lipase mostrou se estável pois mesmo após 24 horas de incubação a 30°C 99% da atividade original permaneceu. A composição de aminoácidos das lipases A e B é similar.

TSUZUKI & SUZUKI em 1991 (245) prepararam lipase de Pseudomonas fragi 22.39B tornando-a solúvel em solvente orgânico e compararam a reatividade e especificidade de substrato desta enzima com a lipase nativa de Pseudomonas fragi. A modificação da lipase foi realizada com detergente sintético didodecil glicosil glutamato de forma a ter 150 ± 30 moléculas de detergente ligadas a uma molécula de lipase. A temperatura ótima para hidrólise foi 37°C tanto para enzima modificada como para enzima original. Não houve diferença substancial na termoestabilidade das enzimas, após incubação

continua a 37°C por 24 horas a atividade residual da lipase nativa e da solúvel em solvente orgânico foi 90 e 75% da atividade original respectivamente.

McNEILL et alii, em 1991 (148) descreveram a aplicação do processo de glicerólise enzimática para sintetizar monoglicerídeos a partir de várias espécies de óleos e gorduras, utilizando os triglicerídeos de óleo de dendê, triestearina de dendê, trioleína de dendê. A produção de monoglicerídeos aumentou quando a temperatura na faixa de 30-50°C foi reduzida. Com relação a concentração de água durante a glicerólise de óleo de dendê a 42°C o teor de água na fase do glicerol variou de 0,5 a 11%. A taxa inicial de conversão de triglicerídeo foi proporcional ao teor de água na faixa de 0,5 a 4%, e de 4 a 11% o aumento na taxa foi consideravelmente mais baixo. Dentre as várias lipases testadas a maior produção de monoglicerídeos foi obtida com lipases de P. fluorescens e C. viscosum tanto para trioleína como para triestearina de dendê a 40°C.

McNEILL & YAMANE em 1991 (147) estudaram a otimização de produção de monoglicerídeos durante a glicerólise de óleos e gorduras utilizando várias enzimas comerciais disponíveis, e misturas de lipases comparando com lipases isoladas e programação de temperatura durante a reação. Foi usada a temperatura de 42°C para glicerólise de banha de boi. A mais alta produção de monoglicerídeo foi obtida com lipase de Pseudomonas sp. As lipases de Geotrichum candidum, Candida rugosa e Penicillium camemberti foram inativas nas condições

utilizadas. A mistura de lipases combinadas foi testada com lipase de P. camemberti que foi misturada individualmente com três outras lipases. Em geral, foi observado que quanto mais alta a concentração de lipase G resultava numa maior produção de monoglicerídeo. A adição de lipase de Penicillium camemberti à lipase de Pseudomonas não aumentou a taxa de síntese de monoglicerídeos. Utilizando a programação de temperatura para glicerólise de banha com lipase de Pseudomonas foi obtida produção de cerca de 90% de monoglicerídeo quando o sistema foi incubado a 42°C por 8 horas e transferido para banho maria a 5°C por 4 dias, sendo o melhor resultado obtido dentre todos os processos testados.

RIVERA-MUNOZ et alii, em 1991 (199) estudaram a produção de lipases de diversos microrganismos utilizando fermentação sólida selecionando o mais adequado para produzir aroma e sabor de produtos laticíneos. Foi utilizado farelo de trigo como fonte de nitrogênio, sendo o substrato umidificado com solução contendo KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e solução de elementos traço, o pH foi ajustado para 7,0 antes da esterilização. O meio líquido teve a mesma composição mas foi suspenso em 90 ml de H_2O . Os microrganismos foram incubados a 29°C. Para a seleção foram considerados os microrganismos que apresentaram alta atividade lipolítica e baixa atividade proteolítica. Penicillium candidum, Mucor miehei e Penicillium camembertii foram claramente superiores a outras linhagens. Os filtrados destas culturas foram usados para modificar gordura

de leite e um lipolísado de P. candidum foi o mais aceito em análise sensorial.

ERGAN et alii, em 1991 (39) usaram lipases em sistemas multifásicos compostos somente de substratos, livres de solvente, de Mucor miehei, sendo utilizada a lipase comercial de Mucor miehei imobilizada em resina de troca iônica. Utilizando concentração estequiométrica de ácido oleico e glicerol foi obtida a síntese de triglicerídeo após 48 horas de reação, em sua quase totalidade. Também foram testados como substratos para a síntese de triglicerídeos 1,2-dioleína e ácido oleico e 1,3-dioleína e ácido oleico. A enzima preferiu usar 1,2-dioleína como substrato o que levou a conclusão que como a lipase de Mucor miehei é 1,3 específica ela produz inicialmente 1,3-dioleína que é isomerizada à 1,2-dioleína que por sua vez sofre esterificação final para triglicerídeo. A hidrólise de triglicerídeo foi realizada com a mesma enzima. Os autores verificaram que a quantidade ótima de água é cerca de 50% do equivalente de ácido oleico a ser hidrolísado, e que com a lipase imobilizada a água na hidrólise deve ser considerada somente como substrato de reação e não como solvente.

YANG & RHEE em 1991 (259) imobilizaram a lipase de Candida rugosa em DEAE-Sephadex A-50 para realizar hidrólise contínua de óleo de oliva usando fluxo contínuo de solvente orgânico (isooctano) e solução aquosa de tampão. Neste tipo de reação contínua num sistema difásico a meia vida operacional da lipase foi estendida tanto quanto a concentração do substrato foi aumentada, sendo de 220 horas com 20% de óleo de oliva.

Nesta concentração de substrato o grau de conversão foi cerca de 90% e a concentração de glicerol 6% indicando que os triglicerídeos foram quase totalmente hidrolisados. A adição de glicerol à solução tampão estendeu a meia vida operacional da enzima imobilizada de 220 horas para 450 horas, sem inibição da enzima, agindo como estabilizador efetivo contra desnaturação térmica e contra desnaturação pelo solvente.

TOTANI & HARA em 1991 (239) descreveram um método de preparação de fosfolipídeos polinsaturados pela reação de transesterificação com lipase de Candida cylindracea (rugosa) e Rhizopus delemar entre fosfolipídeo de soja e óleo de sardinha. A reação foi realizada a 37°C com rotação de 350 rpm. A taxa de transesterificação aumentou gradualmente com o aumento do óleo de sardinha adicionado. Para evitar hidrólise do fosfolipídeo a reação de transesterificação foi realizada com glicerina, tendo aumentado o rendimento do fosfolipídeo transesterificado de 20% para mais que 40%. Com relação à composição de ácido graxo do fosfolipídeo foi verificado que grau de insaturação do fosfolipídeo obtido com Rhizopus delemar foi mais alto que com Candida cylindracea. Os conteúdos de ácido eicopentanóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) do fosfolipídeo transesterificado não foram tão altos nem com a lipase de C. cylindracea nem com a lipase de R. delemar, pois ambas reações foram realizadas com óleo de sardinha que contém somente 2,6% de EPA e 9,8% de DHA, no entanto se forem utilizados óleo de peixe concentrado como substrato pode ser obtido fosfolipídeo de alto grau de insaturação com o uso de lipases microbianas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos

- Reagentes químicos: Ácidos, bases, sais minerais, solventes (Merck, Carlo Erba, Riedel ou Equivalente).
- Reagentes Específicos: P-cloromercuriobenzoato, iodoacetamida, L-cisteína, soro albumina, paranitrofenil-laurato (PNPL), paranitrofenol, comercializados pela Sigma.
- Ácidos Graxos: ácido láurico, ácido butírico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, Triton x100 (isooctil phenil polyoxietilene) (Riedel e Sigma).
- Glicerídeos: 1(3)-monoleína, 1,2(1,3)-dioleína, trioleína, tributirina, tricaprilina, tricaproína (Sigma), óleo de oliva extra virgem, marca comercial e monoleína comercial.
- Meios de Cultura: Potato Dextrose Agar (PDA), agar, peptona, protease peptona, extrato de levedura (DIFCO).

- Enzimas: Lipase G de Penicillium sp., lipase N de Rhizopus niveus, lipase D de Rhizopus delemar, obtidas de Amano International Enzyme Co., lipase de Candida rugosa obtida de Meito Sangyo Company. Lipase obtida no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, de linhagem de Geotrichum candidum.

- Resinas: DEAE-celulose (trocador aniônico dietilaminoetil celulose Sigma ref. nº D-08382), CM-celulose (trocador catiônico carboximetil celulose Sigma ref. C-2883).

- Coluna para cromatografia líquida de alta eficiência: ODS-DP18, diâmetro interno 4,6 mm, DP-5 m - 25 cm comprimento, Instrumentos Científicos CG Ltda e coluna Bond Pak C₁₈ 125°A 10 mm (39 x 300 mm).

- Placas de vidro para cromatografia em camada delgada (TLC) 20x20 cm, sílica gel G-60 Merck.

3.1.2. Equipamentos

- Agitador rotatório New Brunswick Scientific.
- Estufas bacteriológicas, Fanem.
- Espectrofotômetro Coleman, 295-E.
- Espectrofotômetro Coleman, 124-D.
- Banhos de água de temperatura controlada, Fanem.
- Potenciômetro Digimed TE-902.
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod. J-2183.
- Coletor de frações Buchler, mod. Fractometer Alpha 200.
- Cromatógrafo CG-480C isocrático, com detector CG-410 de índice de refração e integrador-processador automático, mod. CG-300.
- Cromatógrafo Waters 600-E Power Line com detector Waters 484 de índice de refração e integrador-processador Data-Módulo Waters, mod. 746.
- Banho termostático do respirômetro diferencial Gilson.
- Balança analítica Mettler, mod. H-10.
- Câmara refrigeradora, Gilson.

3.2. Métodos

3.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de enzimas lipolíticas

Com o objetivo de selecionar microrganismos produtores de enzimas lipolíticas foram isolados de solo, frutas, resíduos de indústrias de óleos, e testados inúmeros microrganismos conforme os métodos descritos a seguir.

3.2.1.1. Coleta de amostras

As amostras foram coletadas de diferentes regiões do Estado de São Paulo, Maranhão, Goiás, e de outros países como Bolívia, Chile, Uruguai e Perú. As amostras de solo foram coletadas no interior de matas cerradas ou próximas às margens de rios, de uma profundidade máxima de 10 cm e acondicionadas em sacos plásticos.

Na coleta de amostras de resíduos industriais, estes foram raspados de linhas de processamento de óleos vegetais, acondicionados em sacos plásticos e utilizados imediatamente após a coleta.

3.2.1.2. Isolamento de fungos

Cerca de 1 g de solo, partes de frutas, flores ou resíduos foram adicionados em tubos de ensaio de 15x160 mm contendo 5 ml de água destilada, previamente esterilizados. Os tubos foram agitados e o líquido sobrenadante foi inoculado em placas contendo o meio agar batata dextrosado (extrato de 10 g

de batata, 4 g de glicose e 3 g de agar em 100 ml de água destilada). As placas foram incubadas a 30°C por 48 a 72 horas. As colônias de fungos isoladas foram repicadas em tubos de ensaio contendo o mesmo meio e incubados a 30°C até o desenvolvimento satisfatório das culturas.

3.2.1.3. Seleção preliminar de microrganismos produtores de enzimas lipolíticas

Os fungos isolados de acordo com o item 3.2.1.2., foram inoculados em frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo meio de cultura sólido composto de farelo de trigo e água misturados na proporção 1:1 p/p. Os frascos foram incubados a 30°C por 72-96 horas, após incubação foi acrescentado 100 ml de água destilada sendo o meio triturado com bastão de vidro e a mistura filtrada em papel Whatman nº 1. No extrato aquoso foi determinado a atividade de lipase.

3.2.1.4. Determinação da atividade de lipase

3.2.1.4.1. Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase (acylglycerol acylhydrolases E.C. 3.1.1.3) foi determinada rotineiramente pela titulação de ácidos graxos liberados utilizando-se 1 g de óleo de oliva extra virgem, 4 ml de tampão acetato 0,05M pH 5,6, 10 pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro e 1 ml do extrato aquoso obtido no item 3.2.1.3.

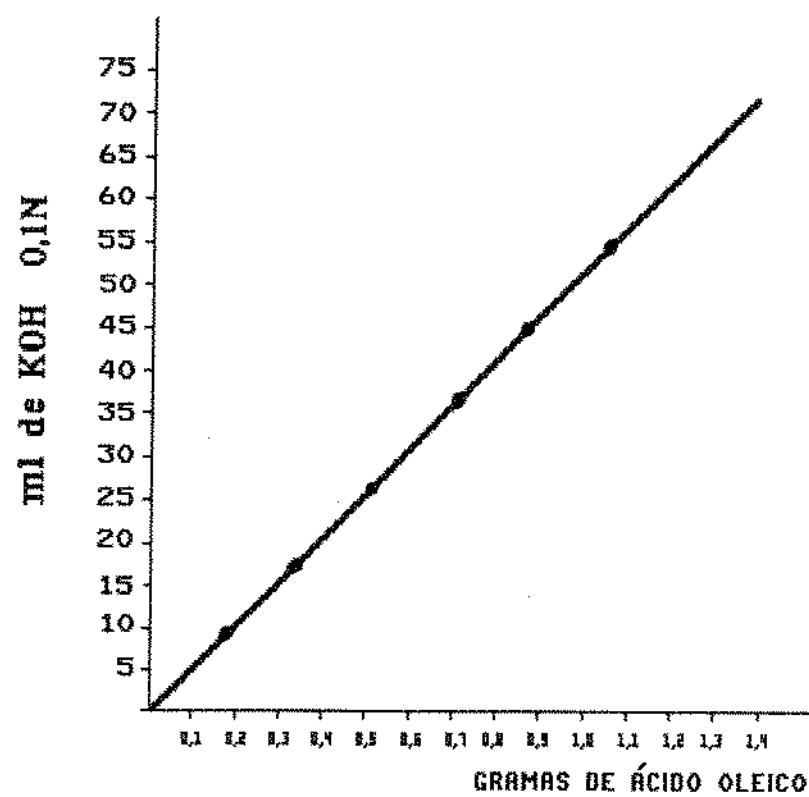
Os frascos Erlenmeyer contendo esta mistura de reação foram incubados a 40°C por 60 minutos com agitação de 130

oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de etanol:acetona na proporção 1:1. Os ácidos graxos livres foram titulados com KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera ácido oleico expresso como μmol de ácido oleico/minuto/ml de enzima. Foi utilizado como Branco a mistura de reação em tempo zero. A Figura 29 apresenta a curva padrão de ácido oleico x ml de KOH 0,1N.

3.2.1.4.2. Determinação da atividade de lipase com substrato monoleína comercial

A atividade de lipase (E.C. glycerol-monoester hydrolase E.C. 3.1.1.23) sobre a monoleína comercial foi determinada misturando-se 1 g de monoleína, 4 ml de tampão fosfato 0,05 M, pH 5,6, 10 pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro e 1 ml do extrato aquoso obtido no item 3.2.1.3. A mistura foi incubada a 40°C por 60 minutos com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml da solução acetona:etanol 1:1 e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera ácido oleico expresso como μmol de ácido oleico/minuto/ml de enzima. Foi utilizado como Branco a mistura de reação em tempo zero.

FIGURA 29 - Curva Padrão da Concentração de Ácido Oleico x Volume de KOH 0,1N.



3.2.1.4.3. Determinação da atividade de lipase com substrato sintético p-nitrofenillaurato

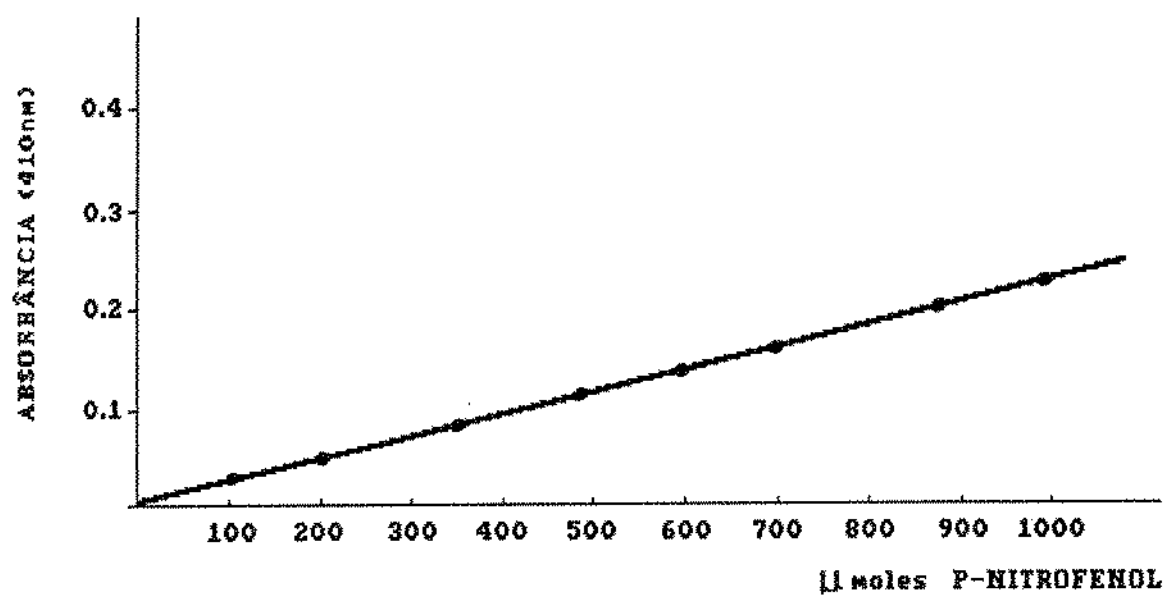
A atividade de lipase (E.C. glycerol-monoesterhydrolase E.C. 3.1.1.23) sobre o substrato sintético p-nitrofenillaurato foi determinada misturando-se 0,95 ml do substrato que foi preparado dissolvendo-se 161 mg de p-nitrofenillaurato (PNPL) em 190 ml de tampão acetato de concentração 52,6 mM, pH 5,6, contendo 2,1% de Triton x-100 pré-incubado a 37°C, com 0,05 ml de enzima.

A mistura é incubada a 37°C por 15 minutos, sendo a reação paralisada pela adição de 2 ml de acetona. A cor amarela produzida pela liberação do paranitrofenol é quantificada pela medida da absorbância da mistura a 410 nm. A Figura 30 apresenta a curva padrão de concentração de paranitrofenol em moles x absorbância a 410 nm. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera paranitrofenol expresso como μ moles de p-nitrofenol por minuto por ml de enzima.

3.2.1.5. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise de lipídeo por ação da lipase

A cromatografia em camada delgada foi realizada misturando-se 45 g de sílica gel G-60 com 90 ml de solução de ácido bórico 0,3M. A mistura é aplicada em placas de vidro 20x20 cm de dimensão com 2 mm de espessura, com aplicador Desaga. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia foi éter de petróleo:éter etílico:ácido fórmico na proporção

FIGURA 30 - Curva Padrão de Solução de Paranitrofenol x Absorbância a 410 nm.



210:90:0,4 (v/v) respectivamente, à temperatura de 25°C. O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 35 minutos. Foram utilizados como padrões trioleína, 1,2(1,3)-dioleína, 1(3)-monoleína na concentração de 1% em solução acetona:etanol 1:1. A revelação do cromatograma foi feita aplicando-se H_2SO_4 50% em H_2O (p/p), e aquecendo-se em estufa a 110°C por 30 minutos, ou através da colocação da placa de cromatografia em câmara de iodo sublimado, aquecendo-se a 110°C por 45 minutos.

3.2.1.6. Purificação de glicerídeos em coluna de alumina neutra

Os glicerídeos foram purificados em coluna de vidro de dimensões 35 cm x 2,5 cm que foi preparada com 200 g de alumina neutra suspensa em 400 ml de éter de petróleo 30-60°C. As amostras a serem purificadas foram dissolvidas em clorofórmio com aquecimento brando a 40°C. Após a aplicação da amostra, a coluna é eluída com éter de petróleo para retirar os triglicerídeos, com uma mistura de éter de petróleo:éter etílico (50:50 v/v) para retirar os diglicerídeos e finalmente com éter etílico para retirar os monoglicerídeos.

3.2.1.7. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos produtos de hidrólise de glicerídeos pela lipase

Os ácidos graxos e glicerídeos presentes nas amostras de óleo vegetal hidrolisados foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou-se coluna de fase reversa ODS-RP-C18 de diâmetro interno de 4,6 mm, DP 5 μ m,

25 cm de comprimento, a temperatura de 30°C com fase móvel acetona:acetonitrila (1:1) com taxa de fluxo de 1 ml/minuto. Os glicerídeos 1(3)-monoleína, 1,2(1,3)-dioleína, trioleína e ácido oleico foram identificados por comparação do tempo de retenção com os padrões 1(3)-monoleína, 1,2- 1,3-dioleína, trioleína e ácido oleico. As porcentagens relativas dos glicerídeos foram obtidas pelo método de integração de áreas utilizando-se o integrador e processador automático CG-300.

3.2.1.8. Identificação e conservação da linhagem produtora de lipase

O microrganismo produtor de lipase foi identificado através das características microscópicas, de acordo com RIJAI (198).

Para a manutenção, o microrganismo foi cultivado em agar batata dextrosado. Após incubação durante 96 horas a 30°C, adicionou-se vaselina líquida esterilizada aos tubos de cultivo. A cultura foi conservada a 5°C com repicagem a cada 9 meses.

3.2.3. Produção de lipase pela linhagem de Trichoderma sp

Para o estudo da produção de lipase pela linhagem de Trichoderma sp selecionada de acordo com o item 3.2.1.3. foi utilizada fermentação semi-sólida e líquida.

3.2.3.1. Produção de lipase por fermentação semi-sólida pela linhagem de Trichoderma sp

O meio de cultura foi composto de farelo de trigo e água na proporção 1:1. Os frascos Erlenmeyer de 500 ml contendo 20 g de meio de cultura previamente esterilizados foram inoculados com 1 ml de suspensão homogênea de esporos preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura de 96 horas do microrganismo em meio inclinado de agar batata dextrosado (PDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 96 horas. Após a incubação foram adicionados 100 ml de água destilada à cada frasco. Os meios de cultura foram triturados com bastão de vidro, e após permanecer em extração por 1 hora com agitação ocasional foram filtrados em papel Whatman nº 1 e coletados num único recipiente. Ao filtrado foi acrescentado 70% de álcool etílico a 5°C com agitação lenta. A mistura foi conservada a 5°C por 8 horas. A proteína assim precipitada foi centrifugada a 11000 x g por 10 minutos. O precipitado foi espalhado em placa de vidro e após secar a temperatura ambiente foi triturado em almofariz à granulação mais fina possível e conservado em congelador. Esta preparação foi designada lipase bruta.

3.2.3.2. Produção de lipase por fermentação líquida pelo microrganismo Trichoderma sp

O meio de cultura foi composto de farelo de arroz 5% e 3% de água de maceração de milho (corn steep liquor) ao qual foi acrescentado 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,0. Os frascos

Erlenmeyer de 250 ml com 40 ml de meio foram esterilizados e inoculados com 1 ml de solução homogênea de esporos preparada com água destilada estéril e com esporos da cultura de 96 horas do microrganismo em meio inclinado de agar batata dextrosado (PDA), e incubados a 30°C com agitação de 150 rpm por 96 horas.

3.2.4. Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação, Alteração de pH do Meio de Cultura e Produção da Enzima a 30°C

Para o estudo da relação entre tempo de fermentação, alteração de pH do meio de cultura e produção da enzima foi realizada fermentação líquida como descrito no item 3.2.3.2. A fermentação foi realizada a 30°C com agitação de 150 rpm. Frascos Erlenmeyer com diferentes tempos de fermentação foram retirados, sendo os meios centrifugados a 11.000 x g por 10 minutos a 10°C. No sobrenadante foi determinado o valor do pH. Para a determinação de atividade enzimática foram utilizados os seguintes substratos: óleo de oliva, monoleína comercial e paranitrofenillaurato. Para efeito de comparação foi realizado o mesmo ensaio com lipase de Geotrichum candidum produzida da mesma forma que a lipase de Trichoderma sp.

3.2.5. Produção e purificação da lipase

3.2.5.1. Produção de lipase

A produção de lipase foi realizada utilizando-se fermentação líquida como descrito no item 3.2.3.2. Após a fermentação o meio de cultura foi centrifugado a 11.000 x g

durante 10 minutos a 10°C. A atividade de lipase no sobrenadante foi determinada de acordo com os itens 3.2.1.4.1. e 3.2.1.4.3. A concentração de proteína da solução enzimática nas diversas etapas da purificação foi determinada de acordo de LOWRY (130) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

3.2.5.2. Purificação da lipase

3.2.5.2.1. Fracionamento da lipase com sulfato de amônio

Um volume de 2.200 ml do sobrenadante do meio de cultura obtido de acordo com o item 3.2.5.1. foi saturado com sulfato de amônio a 80% e a mistura foi mantida a 5°C durante uma noite. O precipitado foi separado por centrifugação a 11.000 x g durante 10 minutos, dialisado contra água destilada a 5°C por um período de 48 horas e em seguida contra tampão acetato 0,05M pH 5,6 a 5°C durante 48 horas. Uma amostra de 130 ml de solução de proteína dialisada foi centrifugada a 11.000 x g durante 10 minutos a 5°C e o sobrenadante foi percolado em coluna DEAE-celulose de acordo com as condições descritas as seguir.

3.2.5.2.2. Cromatografia da lipase em coluna de DEAE-celulose

Cerca de 75 g de DEAE-celulose foi tratada com 500 ml de NaOH 0,5N, filtrada em lâ de vidro e lavada com água destilada para remoção do NaOH. A seguir, a resina foi tratada com 500 ml de HCl 0,5N, lavada com água destilada para remoção do HCl e finalmente equilibrada com tampão acetato 0,05M pH 5,6. A amostra de 130 ml de solução de proteína obtida no item

3.2.5.2.1. foi aplicada em coluna de DEAE-celulose de 2,5 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento equilibrada com tampão acetato 0,05M pH 5,6. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 500 ml de tampão acetato pH 5,6, 0,05M e quantidades de 250 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M contendo concentrações de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 e 0,8M de NaCl consecutivamente. Frações de 10 ml foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso da eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Coleman 124D. A atividade de lipase das frações foi determinada de acordo com os itens 3.2.1.4.1 e 3.2.1.4.3. As frações de número 139 a 155 contendo atividade de lipase foram reunidas num total de 164 ml. Esta solução enzimática foi dialisada contra água destilada durante 48 horas a 5°C e posteriormente dialisada contra solução tampão acetato pH 5,6 0,05M por 48 horas a 5°C.

3.2.5.2.3. Cromatografia da lipase em coluna CM-celulose

Cerca de 50 g de CM-celulose foi tratada com 500 ml de HCl 0,5N, filtrada em lã de vidro e lavada com água destilada para remoção do HCl. A seguir a resina foi tratada com 500 ml de NaOH 0,5N, lavada com água destilada para remoção do NaOH e equilibrada com tampão acetato 0,05M pH 5,6. A amostra de 140 ml de solução enzimática obtida de acordo com o método descrito no item 3.2.5.2.2. foi aplicada em coluna de CM-celulose de 2,5 cm de diâmetro x 50 cm de comprimento. A amostra foi eluída da coluna pela aplicação de 350 ml de tampão

acetato pH 5,6, 0,05M e quantidades de 250 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M contendo concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8M de NaCl consecutivamente. As frações de 10 ml foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações. O curso da eluição das proteínas foi acompanhado pela medida da absorbância a 280 nm e a atividade de lipase foi determinada de acordo com os métodos descritos nos itens 3.2.1.4.1. e 3.2.1.4.3. As frações de número 6 a 16 contendo atividade de lipase foram reunidas num total de 120 ml, sendo dialisada contra água destilada durante 48 horas a 5°C, após a diálise a solução enzimática foi conservada em congelador.

3.2.6. Caracterização da lipase bruta e purificada

A lipase purificada de acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.5.2. e a enzima bruta produzida de acordo com o item 3.2.3.1. foram utilizadas para o estudo de caracterização da lipase.

3.2.6.1. Influência do pH na atividade enzimática

Para o estudo da influência do pH na atividade enzimática o sistema de reação foi constituído de 0,95 ml de p-nitrofenyllaurato dissolvido em solução tampão. Os sistemas tampões foram usados dentro dos limites de sua ação tamponante: acetato-ácido acético pH 3,6 a 5,6 na concentração 0,1M, fosfato monobásico-bibásico de sódio pH 6,0 a 8,0 na concentração 0,1M e tampão ácido bórico-borax 0,1M pH de 8,0 a 9,0. Ao substrato assim preparado foi acrescentado 0,05 ml da

solução de enzima. O ensaio foi realizado com a enzima bruta com 335 unidades/ml de atividade e com a enzima purificada com 54 unidades/ml de atividade. As unidades de atividades foram determinadas de acordo com o item 3.2.1.4.3. As misturas de reação foram incubadas a 37°C em banho de água termostatizado por 15 minutos. Após a incubação foram acrescentados 2 ml de acetona para paralisar a reação e a medida de atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.1.4.3.

3.2.6.2. Influência do pH na estabilidade da enzima

Para o estudo da influência do pH na estabilidade de lipase 0,05 ml da solução de lipase purificada contendo 54 unidades de atividade e outro sistema contendo 0,05 ml de solução de lipase bruta contendo 335 unidades de atividade foram pré-incubadas com 0,3 ml de solução tampão 0,1M de diferentes valores de pH durante 24 horas a 30°C. Foram utilizados os sistemas tampões acetato-ácido acético pH 3,6 a 5,6, 0,1M tampão fosfato monobásico-bibásico de sódio pH 6,0 a 8,0 0,1M e tampão ácido bórico-borax 0,1M pH de 8,0 a 9,0. Após este tratamento foram determinadas as atividades residuais pela adição de 0,65 ml de p-nitrofenillaurato pH 5,6 às soluções de enzimas/tampão e as misturas de reação foram incubadas a 37°C por 15 minutos. Após a incubação foi acrescentado 2 ml de acetona para paralisar a reação e a medida de atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.1.4.3., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.3. Influência da temperatura na atividade enzimática

Para o estudo da influência da temperatura na atividade enzimática o sistema de reação foi constituído de 0,95 ml do substrato p-nitrofenillaurato preparado como no item 3.2.1.4.3. e 0,05 ml da solução de lipase purificada contendo 54 unidades de atividade e outro sistema de reação da mesma composição contendo 0,05 ml da solução de lipase bruta com 335 unidades de atividade. As misturas de reação foram incubadas a diferentes temperaturas entre 25 e 70°C durante 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 2 ml de acetona e a medida da atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.1.4.3. sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.4. Estabilidade térmica da lipase

Para o estudo da termoestabilidade da lipase purificada e bruta, amostras de 0,05 ml de solução enzimática contendo 54 unidades de atividade e 335 unidades das duas lipases respectivamente foram colocadas em tubos de ensaio com tampa e pré-incubados em diferentes temperaturas entre 25 e 65°C durante 1 hora. A atividade residual foi determinada de acordo com as condições descritas no item 3.2.1.4.3., sendo considerada a atividade relativa para efeito de comparação.

3.2.6.5. Influência de sais minerais e outros compostos na atividade enzimática

A influência de sais minerais e outros compostos na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenillaurato foi verificada dentro da faixa de concentração de sais minerais e outros compostos onde não havia interferência com o método de determinação de atividade. Para este estudo o sistema de reação foi constituído de 0,85 ml do substrato p-nitrofenillaurato preparado com tampão acetato pH 5,6 0,05M, e 0,1 ml de solução contendo um dos seguintes compostos: $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, KCl , $CaCl_2$, $FeSO_4$, $NiSO_4$, $AgNO_3$ na concentração necessária para 1 mM e 10 mM em relação ao volume final da mistura de reação; 0,05 ml de solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade. Após 15 minutos de incubação a 37°C foi acrescentado 2 ml de acetona para paralisar a reação e a atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.1.4.3.

Para o estudo da influência de outros compostos na atividade de lipase, o sistema de reação foi composto de 0,85 ml do substrato p-nitrofenillaurato preparado com tampão acetato pH 5,6 0,05M e 0,1 ml de solução contendo um dos seguintes compostos: Triton x-100, desoxicolato de sódio, ácido oleico, ácido linoleico, ácido laurico e ácido n-butírico na concentração necessária para perfazer 10 mM em relação ao volume final da mistura de reação; 0,05 ml de solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade. Após 15 minutos de incubação a 37°C foi acrescentado 2 ml de acetona para

paralisar a reação e a atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.1.4.3.

3.2.6.6. Influência de inibidores na atividade enzimática

A influência de inibidores de enzimas foi verificada semelhantemente a influência de sais minerais na atividade enzimática. O sistema de reação foi constituído de 0,85 ml de p-nitrofenillaurato dissolvido em tampão acetato pH 5,6 0,05M e 0,1 ml de solução de um dos seguintes compostos: p-cloromercúribenzoato, cisteína, iodoacetamida, bissulfito de sódio e mercaptoetanol na concentração necessária para perfazer 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação e 0,05 ml de solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade. A atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.1.4.3.

3.2.6.7. Influência da concentração de substrato na atividade enzimática

A influência da concentração de substrato na atividade de lipase foi testada com os substratos p-nitrofenillaurato, 1(3)-monoleína e 1,2(1,3)-dioleína. No estudo da influência da concentração de lipase o sistema de reação para o substrato p-nitrofenillaurato foi constituído de 0,95 ml de substrato de concentração variável entre 0,05 mM a 10 mM, dissolvido em tampão acetato pH 5,6 0,05M, e 0,05 ml da solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade. As misturas de reação foram incubadas a 37°C por 15 minutos.

Foi adicionado 2 ml de acetona para paralisar a reação e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.1.4.3.

Para o substrato monoleína de pureza 99%, foram preparados sistemas de reação constituídos de monoleína na concentração variável entre 0,16 e 0,80 mM, 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M e 1 ml da solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade.

Com o substrato dioleína pureza 85% 1,2-dioleína, foram preparados sistemas de reação constituídos de dioleína na concentração variável entre 0,28 a 1,40 mM, 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M e 1 ml da solução de enzima purificada contendo 54 unidades de atividade.

As misturas de reação foram incubadas a 40°C por 1 hora. Após incubação foi adicionado 20 ml de solução acetona:etanol na proporção 1:1. O ácido oleico liberado foi titulado contra solução de KOH 0,01N e a atividade enzimática foi calculada como descrito em 3.2.1.4.1.

Para este estudo a constante de MICHALIS-MENTEN (K_m) e a velocidade máxima (max.) foram determinadas segundo o sistema gráfico de LINEAWEAR & BURK (126).

3.2.7. Hidrólise de glicerídeos pela lipase de *Trichoderma* sp

Para o estudo de hidrólise de glicerídeos pela lipase de *Trichoderma* sp. o sistema de reação foi preparado com 1 g do substrato monoleína comercial, 1,2(1,3)-dioleína comercial, monolaurato ou óleo de oliva purificado, 4 ml de tampão acetato

pH 5,6 0,05M, 1 ml de solução de enzima purificada contendo 50 unidades de atividade/ml. A mistura foi incubada a 40°C por vários períodos de tempo com agitação constante de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml da solução de acetona: etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra KOH 0,01N utilizando-se fenolftaleína como indicador. O cálculo da % de hidrólise tomou por base o número de saponificação dos glicerídeos utilizados como substrato, como indicativo da concentração de ácidos graxos totais presente nas amostras, de acordo com o método descrito por KOSUGI & SUZUKI (111). A porcentagem de hidrólise foi calculada considerando-se a acidez titulada das amostras (AT) na mistura de reação e o valor do número de saponificação (VS) do glicerídeo usado, dada pela equação:

$$(\%) \text{ hidrólise} = 100 \cdot \frac{AT}{VS}$$

Foram também utilizados 1(3)-monoleína, 1,2(1,3)-dioleína e trioleína puros nos sistemas de reação. Os produtos de hidrólise foram visualizados através de cromatografia em camada delgada de acordo com o método descrito em 3.2.1.5.

3.2.8. Determinação do número de saponificação

O número de saponificação foi determinado saponificando-se 1 g do glicerídeo misturando-se 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05 M com 25 ml de KOH alcoólico 5,6% em banho de água fervente por 1 hora. O teste em branco foi feito sem a adição do glicerídeo. O excesso de álcali foi titulado contra

HCl 1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. O cálculo do número de saponificação é feito descontando-se o volume gasto de HCl 1N para titulação da amostra do volume gasto de HCl 1N para titulação do branco, multiplicando-se esta diferença de volume pelo equivalente grama do ácido utilizado e pela sua normalidade.

3.2.9. Determinação de carboidratos totais presentes na lipase purificada

O conteúdo de açúcares totais presentes na lipase purificada foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico, de acordo com Dubois et alii (33).

3.2.10. Estudo da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases microbianas combinadas

Para o estudo da hidrólise de óleo de oliva foram testados vários sistemas de reação utilizando-se lipases microbianas comerciais para hidrólise de óleo de oliva em ácidos graxos e glicerol.

3.2.10.1. Determinação da atividade das lipases comerciais

A atividade enzimática das lipases microbianas comerciais de Penicillium sp., Rhizopus niveus, Candida rugosa foi determinada de acordo com o item 3.2.1.4.1.

3.2.10.2. Influência da concentração das lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva

A influência da concentração das enzimas lipase G de Penicillium sp., lipase N de R. niveus, lipase Can de C. rugosa e lipase Geo de Geotrichum candidum foi testada utilizando-se como substrato óleo de oliva extra virgem. As enzimas foram utilizadas nas seguintes concentrações: Lipase G 2,4; 4,8; 7,68; 9,60; 12,0 unidades/mg; lipase N 2,18; 4,36; 6,54; 8,72; 10,90 unidades/mg; lipase Can 1,8; 8,22; 10,28; 12,33; 14,39 unidades/mg; lipase Geo 1,94; 2,58; 3,87; 5,16; 6,45 unidades/mg. O sistema de reação foi composto de 1 g de óleo de oliva, 4 ml de tampão acetato e 10 pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro, sendo incubado a 40°C por 20 horas, com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução acetona:etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de hidróxido de potássio 0,1N sendo os resultados expressos em porcentagem de hidrólise considerando-se o número de saponificação do óleo de oliva.

3.2.10.3. Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas

Para o estudo da influência da combinação de enzimas no grau de hidrólise do óleo de oliva foram utilizados sistemas de reação compostos com 1 g de óleo de oliva, 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M, 10 pérolas de vidro e lipases combinadas da seguinte forma (Can + N), (Can + Geo) e (Can + G). A enzima

de Candida rugosa foi usada na concentração de 10,28 unidades, lipase de R. niveus na concentração de 5,16 unidades, lipase de Penicillium sp 10 unidades. Os sistemas foram incubados a 40°C com agitação de 130 oscilações por minuto. Os ensaios foram realizados com 1, 2, 3, 6 e 12 horas de incubação. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos como descrito no item 3.2.9.2. Foi utilizado como comparação em relação ao grau de hidrólise um sistema de reação com apenas lipase de Candida rugosa num total de 10,28 unidades, a porcentagem de hidrólise foi calculada de acordo com o item 3.2.10.2.

3.2.10.4. Influência da concentração de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases

O estudo da influência da concentração de água no sistema representado pela adição do tampão acetato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva foi realizado com sistema de reação pesando-se 1 g de óleo de oliva em frascos Erlenmeyer de 125 ml e contendo quantidades variáveis de tampão acetato pH 5,6 0,05M de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 ml, aos quais foram acrescentados 1 ml da solução de enzimas combinadas como: (Can + Geo) nas quantidades de 5 + 10 mg por ml respectivamente; (Can + N) nas quantidades de 5 + 10 mg por ml

respectivamente e (Can + G) nas quantidades de 5 + 10 mg por ml respectivamente sendo acrescentadas perólas de vidro de 3 mm de diâmetro em número de 10. Os sistemas foram incubados a 40°C por 16 horas, com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito no item 3.2.10.2.

3.2.10.5. Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas com teor de tampão reduzido no sistema de reação

Para verificar a influência da concentração reduzida de tampão no sistema de reação foram testadas as combinações das lipases seguintes, nas concentrações descritas: Can + Geo (2,5 mg + 4 mg)/ml, Can + N (2,5 mg + 4 mg)/ml; Can + G (2,5 mg + 0,45 mg)/ml. Foi utilizada também a lipase Can isoladamente na concentração de 0,5 mg/ml. O sistema foi composto de 1 g de óleo de oliva, 2 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M, pérolas de vidro e 1 ml da solução de enzima nas proporções descritas acima. Os frascos foram incubados a vários intervalos de tempo, a 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de acetona:etanol (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito no item 3.2.10.2.

3.2.10.6. Influência da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de Candida rugosa

Para o estudo da influência da concentração do substrato óleo de oliva na porcentagem de hidrólise por lipase de Candida rugosa foi preparado sistema de reação composto de óleo de oliva em quantidades variáveis de 1, 2, 3 e 4 g, pesados em frascos Erlenmeyer de 125 ml, aos quais foram adicionados 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M e 1 ml da solução de enzima na concentração de 20 unidades de atividade e 10 pérolas de vidro com 3 mm de diâmetro em cada. Os frascos foram incubados a 40°C em banho de água termostatizado e agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito no item 3.2.10.2.

3.2.10.7. Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva

Para verificar a influência da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva foram preparados sistemas A, B e C de reação com as lipases combinadas: A) Candida rugosa e Rhizopus niveus (Can + N),

sendo a concentração de Can fixa em 20 unidades e a de N variável de 4,36; 6,54; 8,72; 10,90; 13,0; 15,26 unidades. Para o sistema B formado pelas lipases de Candida rugosa e Penicillium sp (Can + G), as concentrações das enzimas utilizadas foram concentração fixa de 20 unidades para Can e concentração da lipase G variável de 1,6; 3,0; 4,0; 6,2; 8,3 unidades. No sistema C de lipases combinadas de Candida rugosa e Geotrichum candidum (Can + Geo), as concentrações utilizadas foram: 20 unidades fixas para Can e as concentrações variáveis para lipase Geo, na faixa de 3,87; 5,16; 6,45; 7,74; 9,0 unidades. Os sistemas de reação foram compostos de 1 g de óleo de oliva, 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M e 1 ml de cada um dos sistemas de lipases combinadas. Os frascos foram incubados a 40°C com agitação de 130 oscilações por minuto por tempo variável de 4, 8 e 24 horas. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito no item 3.2.10.2.

3.2.10.8. Influência da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva

Os sistemas de lipases combinadas (Can + G) e (Can + N), foram preparados variando a concentração de cada uma, alterando-se a proporção entre elas dentro do sistema. O sistema (Can + G) foi preparado com as seguintes proporções de

unidade de atividade por ml das enzimas componentes: (20:0); (18:2); (16:4); (14:6); (12:8); (10:10); (8:12); (6:14); (4:16); (0:20). O sistema (Can + N) foi preparado nas seguintes proporções de unidades de atividade por ml das enzimas componentes: (20:0); (18:2); (16:4); (14:6); (12:8); (10:10); (8:12); (6:14); (4:16); (0:20). O sistema de reação foi preparado em frasco Erlenmeyer de 125 ml composto de 1 g de óleo de oliva, 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M, 10 pérolas de vidro de 3 mm de diâmetro e 1 ml da solução de lipases combinadas descritas acima. Os frascos foram incubados a 40°C em banho de água termostatizado, com agitação de 130 oscilações por minuto por períodos de incubação de 2, 4, 6, 20 horas. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de acetona:etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de hidrólise foi calculada como descrito no item 3.2.10.2.

3.2.11. Estudo da produção de monoglicerídeo através da esterificação de ácido graxo e glicerol por lipase microbiana comercial

O estudo da produção de monoglicerídeo por reação de esterificação enzimática foi realizado utilizando-se ácido oleico p.a. 99%, glicerol p.a. e enzima comercial microbiana. Foram testadas as condições para obtenção do glicerídeo 1(3)-monoleína.

3.2.11.1. Seleção da enzima para reação de esterificação

Para selecionar a melhor lipase comercial para reação de esterificação foram testadas as lipases de Candida rugosa, Penicillium sp e de Rhizopus niveus. O sistema de reação para esterificação foi preparado pesando-se 75 g de ácido oleico, 350 g de glicerol em béquer de 600 ml. Para cada recipiente foi adicionado 500 mg de cada uma das enzimas descritas acima. A mistura foi submetida a agitação de 600 rpm com homogeneizador de hélice, com incubação em banho de água termostatizado a 40°C. Durante a reação foram retiradas alíquotas de 2 ml da mistura de reação, às quais foram acrescentados 20 ml de solução de etanol:acetona (1:1) e o ácido oleico não utilizado foi titulado contra solução de KOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de esterificação foi calculada em relação ao teor de ácido oleico presente no tempo zero de reação e o teor de ácido oleico remanescente após o tempo de reação.

3.2.11.2. Influência da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática

Para o estudo da influência da concentração molar de ácido oleico e glicerol sobre o grau de esterificação foram pesados em frascos Erlenmeyer de 125 ml quantidades de ácido oleico e glicerol de forma a fornecer concentração molar de 1:1, 1:2, 1:3 para glicerol e ácido oleico respectivamente. Aos frascos foram acrescentados 20 mg de lipase comercial de Penicillium sp, sendo incubados a 40°C em banho de água

termostatizado com agitação constante de 130 oscilações por minuto. Os frascos foram retirados em tempos de incubação de 4, 14, 18, 24 e 48 horas. Foram acrescentados 20 ml de solução de acetona:etanol (1:1) e o ácido oleico remanescente foi titulado contra solução de KOH 0,1N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos como porcentagem de esterificação. Aliquotas do sistema de reação acima descrito, com proporção molar entre glicerol e ácido oleico de 1:1 foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) quanto a composição dos produtos de esterificação. Aliquotas de 20 μ l dos sistemas de proporção molar 1:1, 1:2, 1:3 foram aplicadas em cromatografia em camada delgada (TLC).

3.2.11.3. Influência da concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol sobre o grau de esterificação enzimática

Em frascos Erlenmeyer de 125 ml foram pesados glicerol e ácido oleico de forma a fornecer as seguintes concentrações molares, entre glicerol e ácido graxo: 3,94:0,12; 3,80:0,26; 3,47:0,5; 3,07:1,0 e 2,05:2,0. Aos frascos foi adicionado 20 mg de lipase de Penicillium sp, sendo incubados a 40°C com agitação de 130 oscilações por minuto, por períodos variáveis de 14, 24, 40 e 64 horas. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de acetona:etanol (1:1) e o curso da reação de esterificação foi seguido pela titulometria com solução de KOH 0,1N, cromatografia em camada delgada (TLC) e a composição dos glicerídeos foi analisada por cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o método descrito em 3.2.1.7.

3.2.11.4. Influência da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol no grau de esterificação enzimática

O estudo da influência da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol foi realizado variando-se a concentração do ácido oleico em 0,06; 0,12; 0,26; 0,50; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0 moles. A concentração de glicerol em todos os sistemas de reação foi 3,8 moles. O sistema de reação com as concentrações de ácido oleico e glicerol foram preparados em frascos Erlenmeyer de 125 ml, tendo sido acrescentado 20 mg de lipase comercial de Penicillium sp, e incubados a 40°C por tempo variável de 24, 40 e 64 horas. A reação foi paralisada pela adição de 20 ml de solução de etanol:acetona (1:1). A porcentagem de esterificação foi calculada através da titulação do ácido oleico remanescente no sistema de reação, com hidróxido de potássio 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador. Os produtos da reação de esterificação enzimática foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e expressos em porcentagem de glicerídeos formados.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e Seleção de Microrganismos

4.1.1. Seleção preliminar de microrganismos produtores de lipase

Após o isolamento de 1285 linhagens de microrganismos foram selecionados preliminarmente 8 fungos que apresentaram alta atividade de lipase com relação ao teste descrito no item 3.2.1.3.

A Tabela 1 indica a atividade de lipase das linhagens selecionadas com relação aos substratos óleo de oliva, monoleína comercial e p-nitrofenillaurato.

O modo de ação das enzimas lipolíticas sobre óleos e gorduras está ilustrado nas Figuras 1 e 2.

A ação de lipases pode se dar através da clivagem das ligações ésteres de glicerídeos liberando ácidos graxos, monoglicerídeos ou diglicerídeos, ou ainda através das interesterificação de óleos e gorduras produzindo monoglicerídeos e diglicerídeos desejados ou alterando a composição de ácidos graxos de óleos e gorduras.

O direcionamento nos meios reacionais é possível devido as diferentes especificidades apresentadas pelas lipases.

Tabela 1 - Seleção de microrganismos produtores de lipase.

Nº da Linhagem	Substrato		
	óleo de Oliva μ moles Ácido Oleico/min/ml	Monoleína Comercial μ moles Ácido Oleico/min/ml	p-nitrofenillaurato μ moles p-nitrofenol/ min/ml
129	6,73	4,72	253,3
155	3,66	5,31	240
211	7,56	3,66	240
245	4,01	5,31	240
249	7,44	4,49	226
460	4,01	4,13	240
509	4,60	3,59	266,6
817	1,18	7,08	400

FIGURA 1 - Representação Esquemática da Ação de Enzimas Lipolíticas.

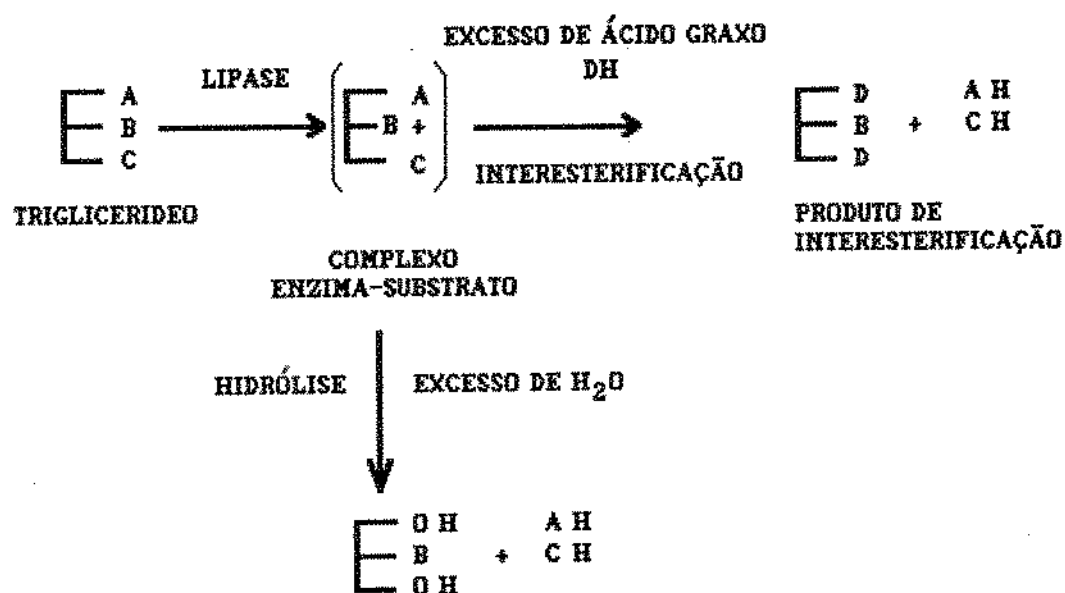
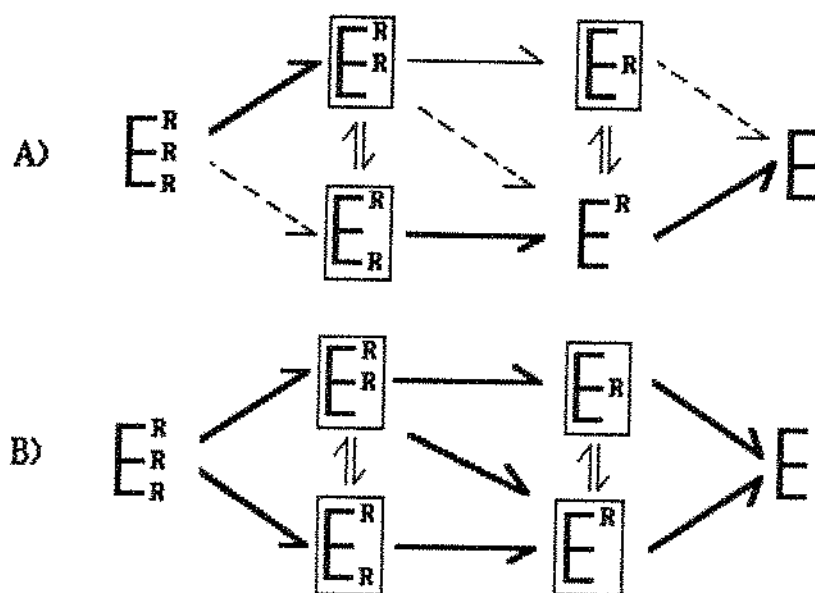


FIGURA 2 - Sequência de Reações das Lipases na Hidrólise de óleos e Gorduras.



A) - Lipase com especificidade posicional

B) - Lipase sem especificidade posicional

E glicerol, R : Ácido graxo; $\rightleftharpoons$ isomerização espontânea,

$\longrightarrow$ hidrolisado; $\dashrightarrow$ não hidrolisado

$\square$ produto acumulado na mistura de reação

4.1.2. Seleção do microrganismo melhor produtor de lipase

A linhagem de Nº 817 foi selecionada como a melhor produtora de lipase, dentre 8 linhagens preliminarmente selecionadas, por apresentar maior atividade de lipase na presença dos substratos monoleína e p-nitrofenillaurato.

Para a triagem dos microrganismos utilizou-se fermentação semi-sólida de acordo com o método descrito no item 3.2.1.3.; seguido da separação dos extratos brutos enzimáticos. Estes extratos foram analisados quanto à atividade lipolítica através da titulação dos ácidos graxos liberados nas reações de hidrólise dos substratos óleo de oliva e monoleína comercial, ou através da medida de absorbância do p-nitrofenol liberado quando utilizado p-nitrofenillaurato como substrato.

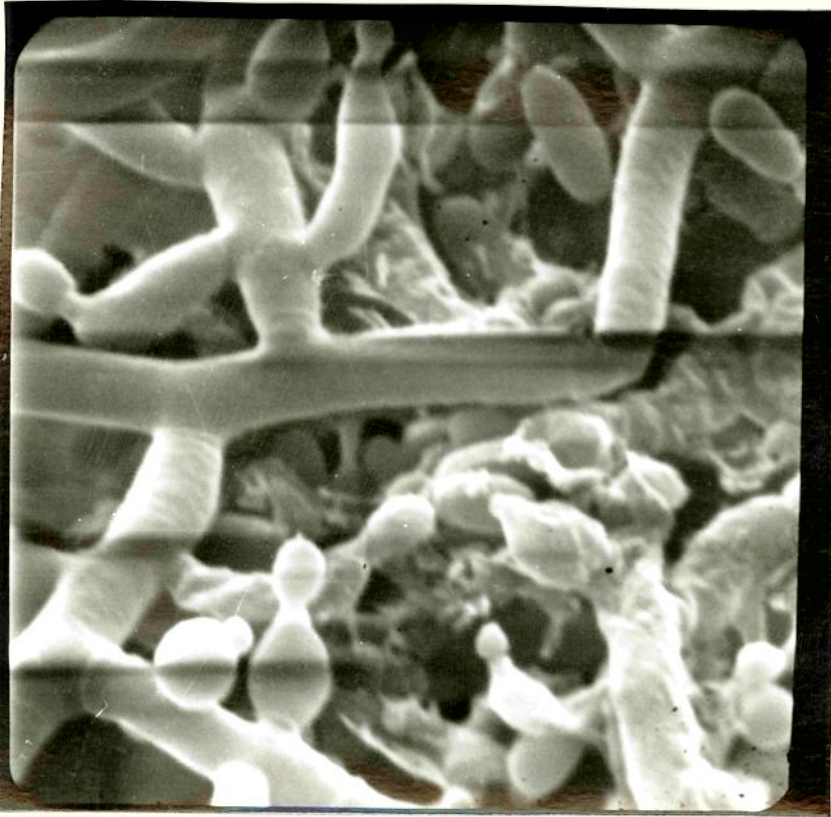
Diversos pesquisadores têm estudado enzimas lipolíticas que atuam sobre monoglicerídeos, (42, 17) de tecidos animais, e há escasso estudo sobre lipases de origem microbiana que hidrolisam preferencialmente monoglicerídeos (175).

4.2. Identificação da Linhagem Produtora de Lipase

A linhagem de Nº 817 melhor produtora de lipase foi identificada como Trichoderma sp. de acordo com as características microscópicas descritas por RIJAI (198).

As características microscópicas estão ilustradas na Figura 3, que mostra a eletromicrografia do microrganismo.

FIGURA 3 - Eletromicrografia de Trichoderma sp.



30 000 X



10500 X

As colônias da linhagem de N° 817 apresentaram rápido crescimento em meio PDA (Potato Dextrose Agar) quando incubadas a 30°C, e pigmentação verde. Como pode ser verificado na Figura 3 o micélio é composto de hifas hialinas, septadas e muito ramificadas.

Os conidióforos são altamente ramificados, sendo que os ramos principais produzem numerosos ramos laterais menores. Todos os ramos emergem em largo ângulo em relação ao tronco de sustentação do ramo.

Os phialídeos são em forma ovóide, mais estreitos na base, aumentando em diâmetro no meio e diminuindo abruptamente de diâmetro no ápice.

Diversos microrganismos produtores de lipase, por exemplo Pseudomonas fragi (4, 5, 131, 132), Staphylococcus aureus (4), Geotrichum candidum (86, 138, 243, 74), Acrhomobacter lipolyticum (91), Penicillium roqueforti (3, 35), Torulopsis ernobii (260), Mucor pusillus (220, 222), Pseudomonas lipolytica (109), Brevibacterium linens (227), Rhizopus arrhizus (16), Rhizopus delemar (71), Mucor lipolyticus (158), Penicillium cyclopium (70, 174), Mucor javanicus (66), Mucor miehei (153), Aspergillus niger (244, 180, 173, 73), Mucor hiemalis (2), Rhizopus microsporum (264), Candida deformans (154), Rhodotorula pilimanae (155), Aspergillus oryzae (7), Saccharomycopsis lipolytica (48), Aspergillus foetidus (161), Rhizopus oligosporus (160), Pseudomonas fluorescens (235), Thermomyces lanuginosus (237), Penicillium citrinum (231), Candida rugosa (76, 146, 178, 147,

259, 239), têm sido descritos na literatura, no entanto não tem sido descrito até o momento, lipase produzida por microrganismo do gênero Trichoderma.

4.3. Produção de Lipase pela Linhagem de Trichoderma sp.

Foram utilizados dois processos fermentativos para produção de enzima de acordo com o método descrito no item 3.2.3.

Foi obtida maior produção de enzima bruta na fermentação semi-sólida, porém a maior atividade da enzima foi obtida na fermentação líquida, sendo que a mesma composição do meio foi utilizada por OKUMURA et alii (175) e TSUJISAKA et alii (243) para produção de lipases de Penicillium cyclopium e Geotrichum candidum respectivamente. PAL & KUNDEE (180) relataram a importância da fonte rica de nitrogênio orgânico na produção de lipases de Aspergillus niger em cultura submersa. EINTNMILLER et alii (35) estudando fatores que afetam a produção de lipase de Penicillium roqueforti testou os meios de cultura comerciais Proplo, Bacto-Casitone, solução Czapeck-Agar. O fungo não produziu lipase no meio Czapeck, levando a conclusão que NaNO_3 que é a única fonte de nitrogênio no meio Czapeck, é uma fonte muito pobre para crescimento e produção da enzima.

O estudo de relação entre tempo de fermentação, produção de lipase pela linhagem de Trichoderma sp foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.4.

As Figuras 4 e 5 ilustram a relação entre tempo de fermentação, alteração do pH do meio de cultura e produção de lipase a 30°C, de Trichoderma sp linhagem Nº 817 e Geotrichum candidum respectivamente.

Como demonstra a Figura 4, na fermentação realizada a produção de lipase de Trichoderma sp atingiu a atividade máxima de 2,4 unidades/ml após 72 horas de fermentação aproximadamente, utilizando-se monoleína como substrato.

A atividade lipolítica contra o substrato paranitrofenilaurato (PNPL) atingiu o máximo de 551 unidades/ml após 96 horas de fermentação.

Com relação ao substrato óleo de oliva este foi escassamente transformado pela lipase de Trichoderma sp mesmo após 160 horas de incubação, ocorrendo um incremento não significativo de atividade entre 140 e 160 horas de incubação.

Esta característica de hidrolisar muito pouco o substrato trioleína (óleo de oliva) e hidrolisar rapidamente monoacilglicerol de 12 a 18 átomos de carbono contrasta com a lipase de Geotrichum candidum que foi utilizada no mesmo tipo de ensaio para comparação.

A lipase de G. candidum atingiu a atividade máxima de 5,5 unidades/ml contra óleo de oliva após 72 horas de fermentação aproximadamente. Com relação ao substrato monoleína a atividade máxima de 2,3 unidades/ml foi atingida após 96

FIGURA 4 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação e Produção de Lipase pela linhagem de *Trichoderma* sp. Nº 817.

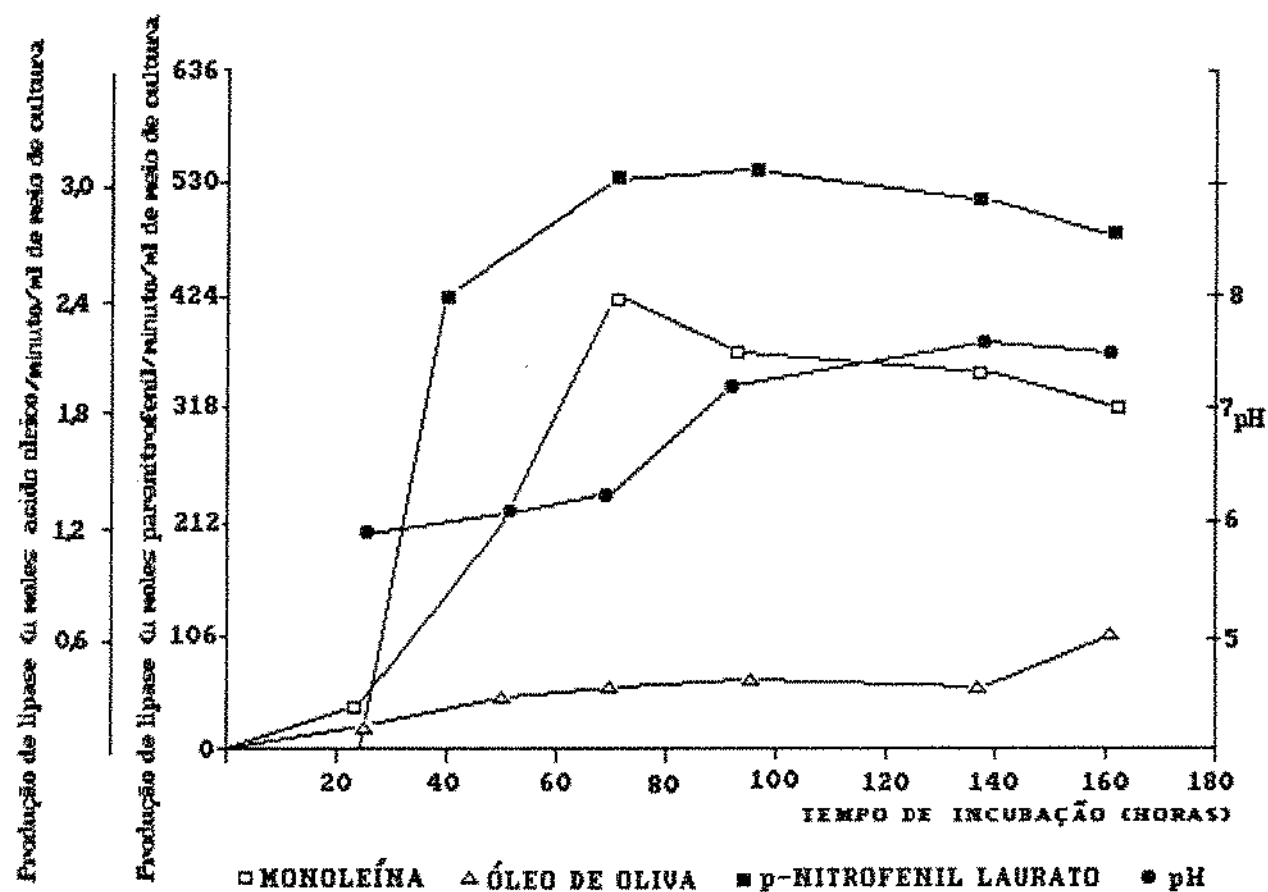
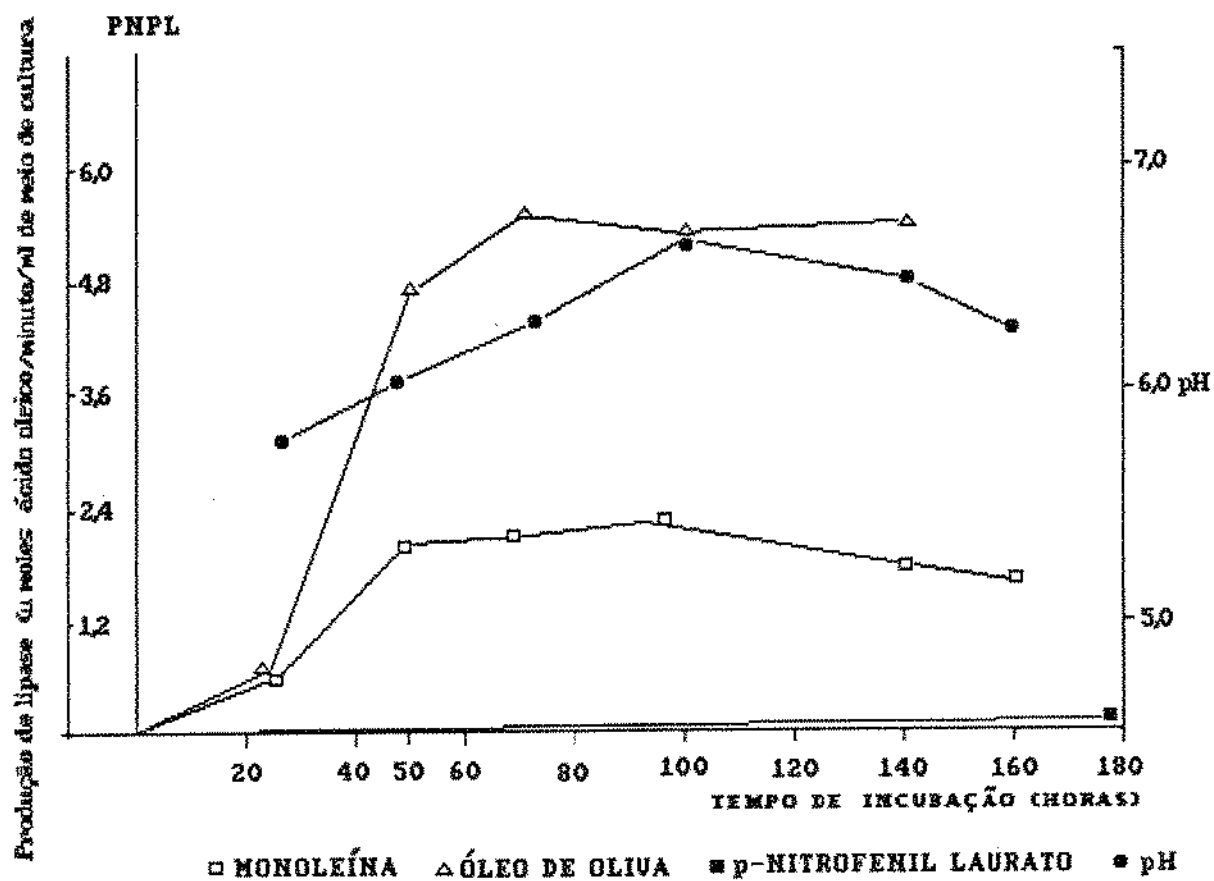


FIGURA 5 - Estudo da Relação entre Tempo de Fermentação e Produção de Lipase pela linhagem de Geotrichum candidum.



horas de fermentação, sendo cêrca de 50% da atividade contra o substrato óleo de oliva. O substrato paranitrofenilaurato não foi hidrolisado pela lipase de G. candidum mesmo após 160 horas de incubação.

OKUMURA, IWAI & TSUJISAKA, em 1980 (175) empregando meio de cultura composto de farelo de arroz 4% e água de maceração de milho (Corn Steep Liquor) 3% pH 6,0 produziram lipase de Penicillium cyclopium M₁ que apresentou característica semelhante à lipase de Trichoderma sp com relação à produção de enzima lipolítica com atividade contra monoleína e atividade incipiente contra triglicerídeos. Os autores caracterizaram esta enzima como parcial glicerídeo-hidrolase.

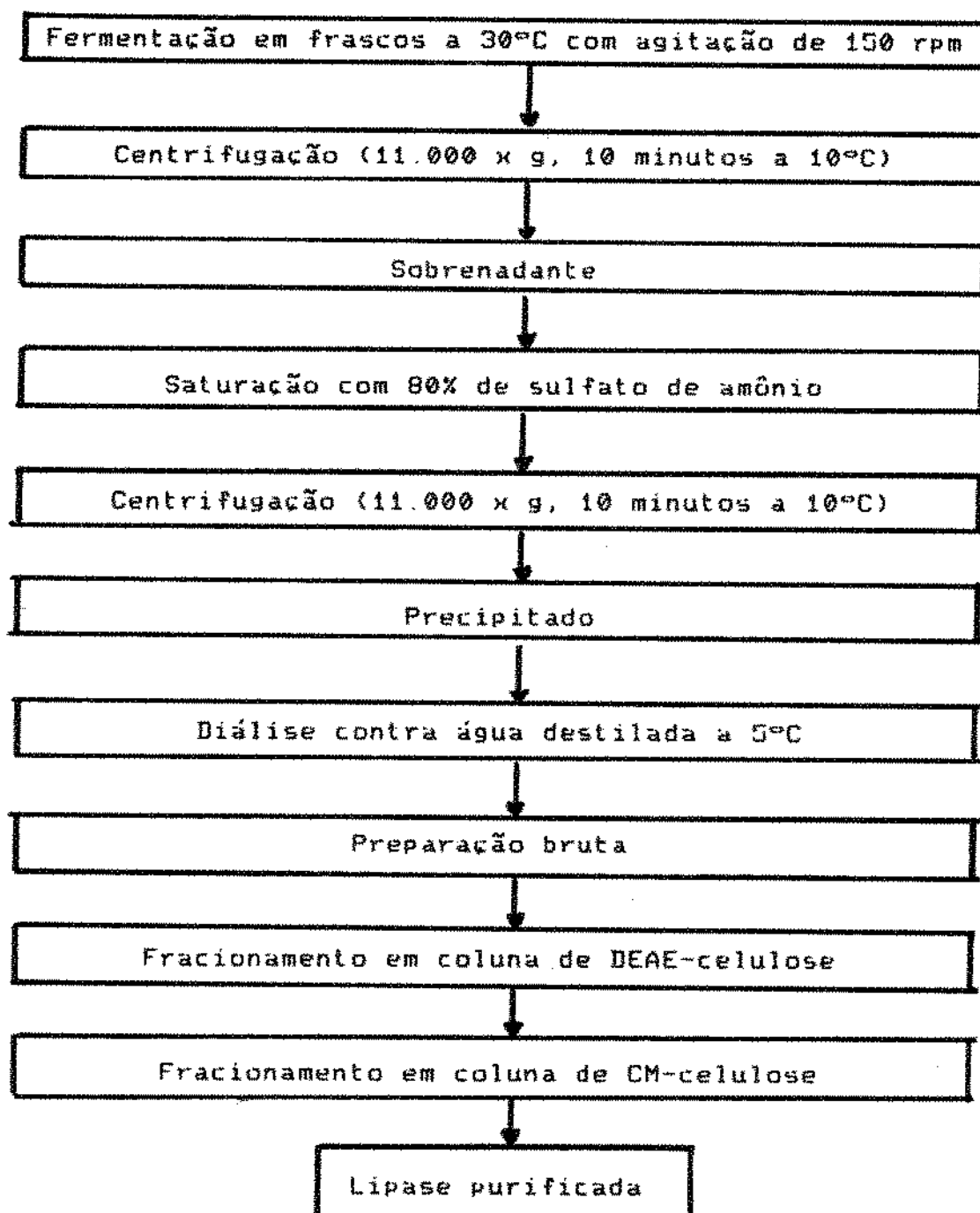
BERGLUND et alii, 1980 (17), conseguiram dessociar vários tipos de lipases (acil-hidrolases: monoacil-hidrolases, diacil-hidrolases, triacil-hidrolases) de um complexo rico em lipídeos contendo lipase do tipo hormônio-sensível de tecido adiposo de galinha. Esta dissociação foi realizada através de tratamento da enzima com Triton X-100.

4.4. Produção e Purificação de Lipase

A produção e purificação de lipase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.5.

O fluxograma de purificação da lipase de Trichoderma sp está descrito na Figura 6.

FIGURA 6 - Fluxograma de Produção e Purificação de Lipase de *Trichoderma sp.*



A lipase de Trichoderma sp Nº 817 pode ser obtida através da filtração da massa celular. A enzima é obtida de forma extracelular.

Neste trabalho foi estudada a purificação desta enzima extracelular.

No fracionamento da preparação bruta de lipase em coluna de DEAE-Celulose equilibrada com tampão acetato pH 5,6 0,05M, a enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão acetato 0,05M pH 5,6 contendo 0,03M de NaCl. A lipase não foi adsorvida em coluna de CM-Celulose. As Figuras 7 e 8 ilustram respectivamente o fracionamento da lipase em coluna de DEAE-Celulose e CM-celulose. A purificação está sumarizada na Tabela 2. A enzima foi purificada 16,2 vezes após fracionamento com sulfato de amônio seguido de cromatografia em coluna DEAE-celulose e CM-celulose. A lipase purificada apresentou 1443 unidades de atividade/mg de proteína.

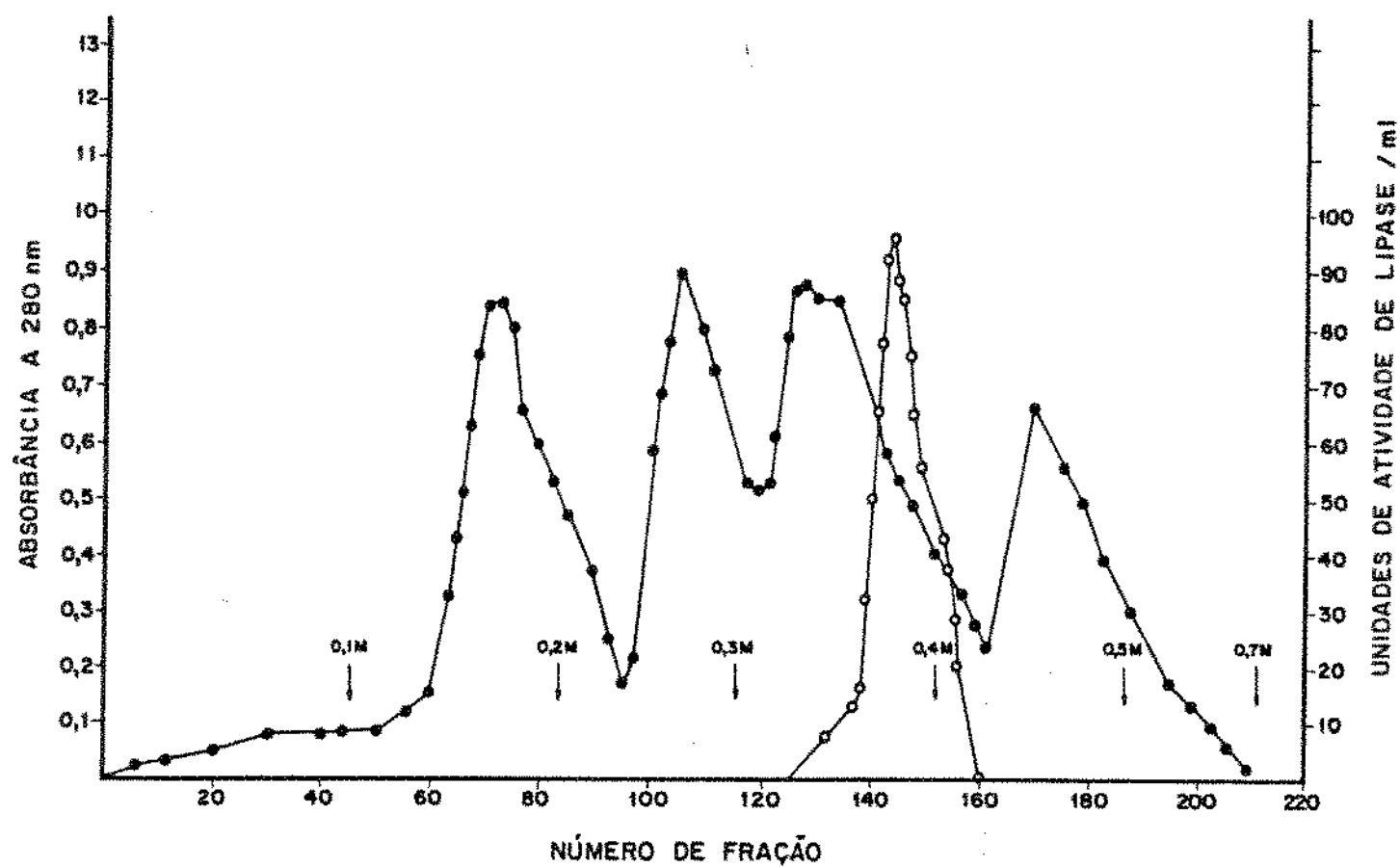
4.5. Caracterização da Lipase Bruta e Purificada

As características bioquímicas da lipase de Trichoderma sp Nº 817 foram determinadas como descrito no item 3.2.6.

4.5.1. Efeito do pH na atividade enzimática

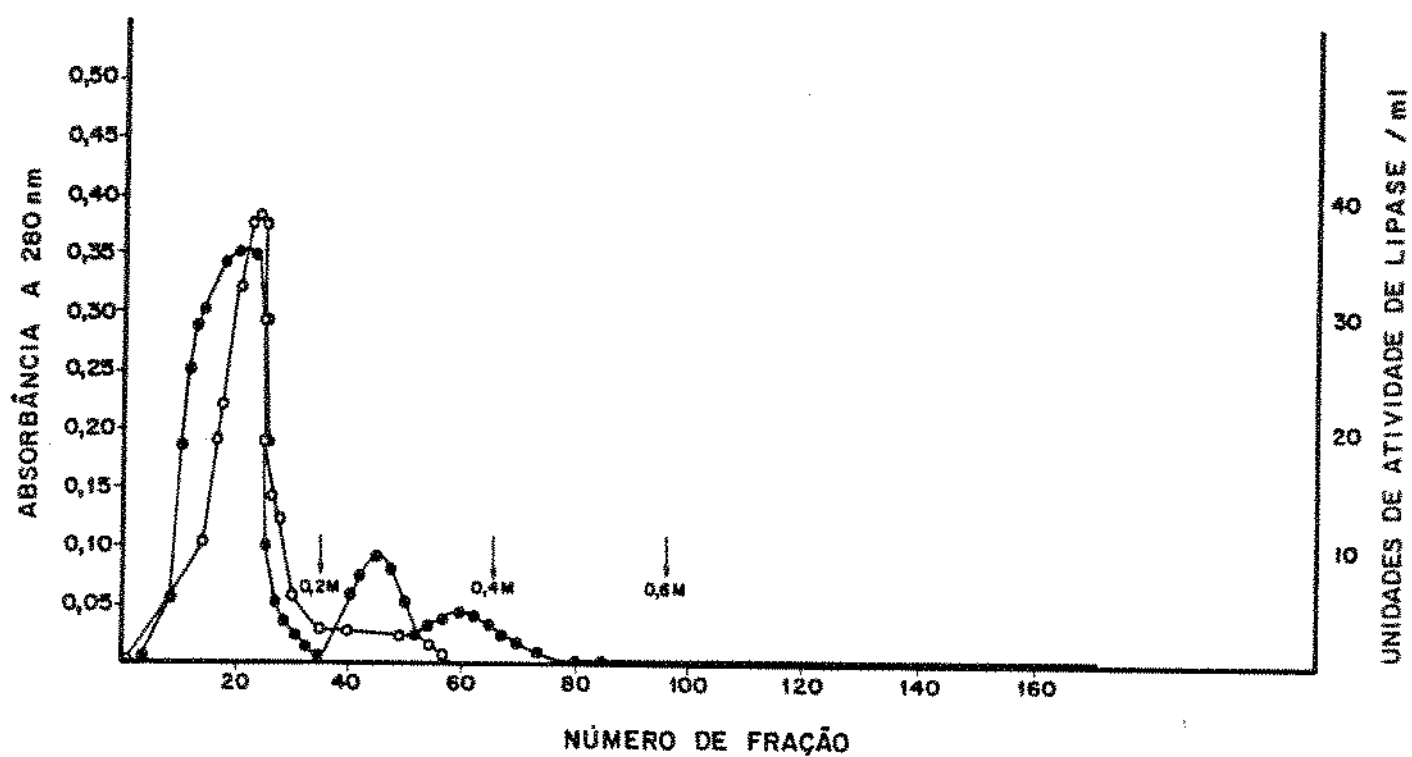
O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.1. A

FIGURA 7 - Cromatografia de Lipase em Coluna de DEAE-celulose.



- ABSORBÂNCIA 280 nm
- ATIVIDADE DE LIPASE

FIGURA B - Cromatografia de Lipase em Coluna de CM-celulose.



- ABSORBÂNCIA 280 nm
- ATIVIDADE DE LIPASE

Tabela 2 - Purificação da lipase extracelular de Trichoderma sp.

Etapa de Procedimento	Volume (ml)	Unidades/ml (μ moles PNP/min)	Atividade Total Unidades	Proteína (mg/ml)	Atividade Específica (Unidades/mg) Proteína	Purificação (%)	Recuperação (%)
Sobrenadante do meio de cultura	2200	400	880.000	4,5	88,9	1	100
Fracionamento com sulfato de amônio	60	11967,2	718032,0	24,5	488,49	5,5	81,6
Cromatografia em coluna DEAE-celulose	140	133,46	18670,4	0,125	1066,88	12,0	2,12
Cromatografia em coluna CM-celulose	120	86,66	10399,2	0,06	1443,3	16,2	1,18

Figura 9 mostra que tanto a lipase purificada de Trichoderma sp Nº 817 quanto a bruta, apresentou maior atividade em tampão acetato pH 5,6.

A lipase produzida pela linhagem de Trichoderma sp apresentou atividade ótima em pH ligeiramente ácido, da mesma forma que as lipases A, B e C produzidas por Rhizopus delemar conforme relatado por IWAI & TSUJISAKA em 1974 (71). A lipase de Penicillium cyclopium M₁ descrita por OKUMURA et alii, 1980 (175) denominada parcial glicerídeo-hidrolase apresentou pH ótimo de 6,0 em tampão fosfato.

As enzimas estudadas por AKHTAR (2) de Mucor hiemalis e por SOMKUTI et alii (222) de Mucor pusillus apresentaram pH ótimo de 7,0 e 5,0 a 5,5, respectivamente. As lipases produzidas por linhagens de Staphylococcus descritas por VADEHRA (248) apresentaram pH ótimo de 8,3.

A Tabela 3 ilustra o pH ótimo de atividade de lipases microbianas.

4.5.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.6.2.

As Figuras 10 A e B ilustram o efeito do pH na estabilidade da enzima. As lipases de Trichoderma sp purificada e bruta apresentaram-se mais estáveis na faixa de pH de 5,0 a 7,0; sendo inativada a pH inferiores a 5,0, após 24 horas de incubação a 30°C. Em comparação as lipases produzidas por Rhizopus delemar estudadas por IWAI & TSUJISAKA (71)

FIGURA 9 - Efeito do pH na Atividade de Lipase Bruta e Purificada.

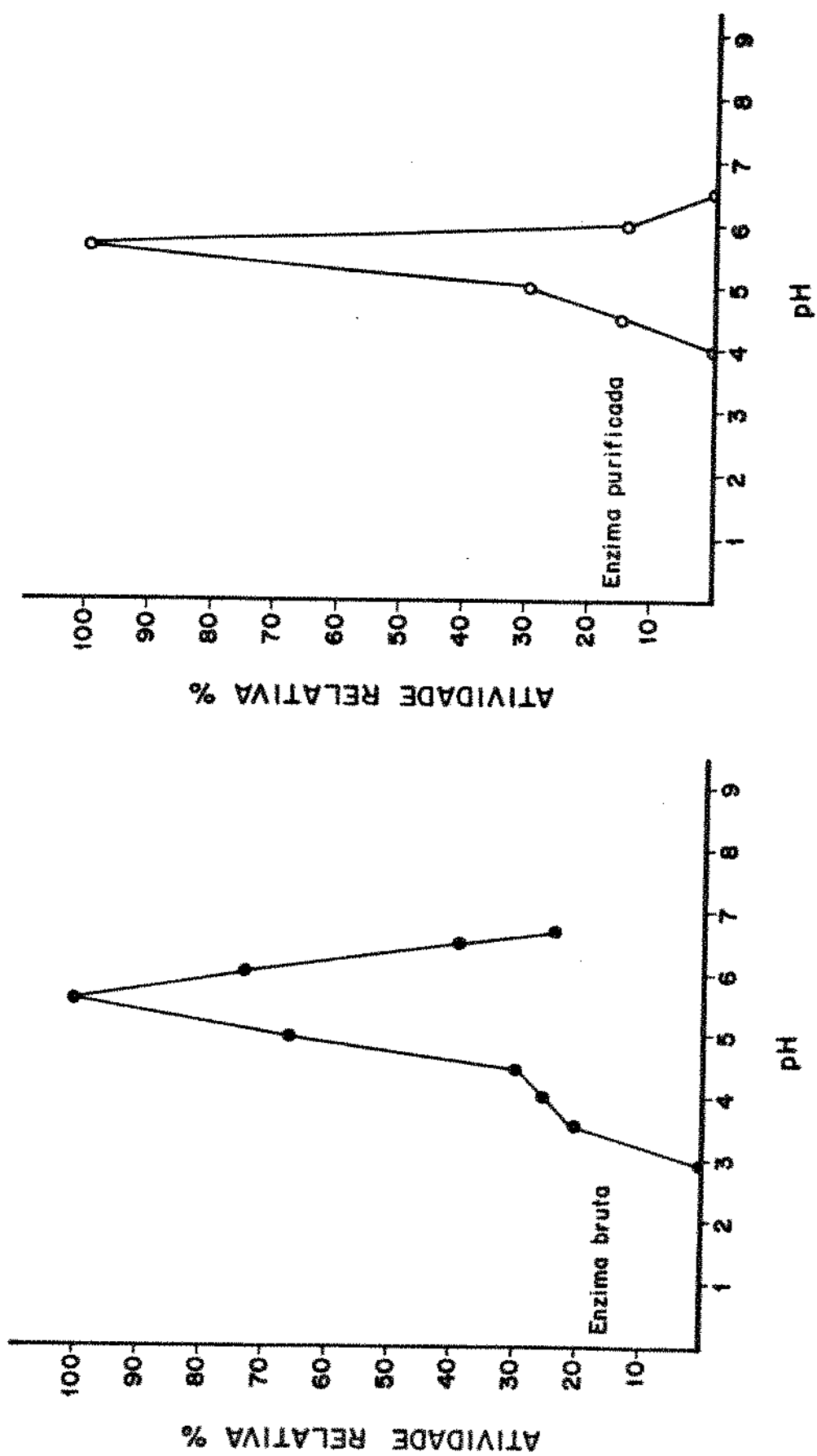


Tabela 3 - Lipases microbianas

Enzima	Fonte	pH ótimo de Atividade	Temperatura ótima de Atividade °C	Referência
Lipase	<u>Mucor miehei</u>	8,5	45	153
Lipase A	<u>Penicillium cyclopium</u> Westring	7,0	35	70
Lipase B	<u>Penicillium cyclopium</u> Westring	6,0	40	70
Lipase	<u>Mucor javanicus</u>	7,5	37	66
Lipase	<u>Staphylococcus aureus</u>	8,3	45	247
Lipase	<u>Geotrichum candidum</u>	8,9	37	138
Lipase A	<u>Rhizopus delemar</u>	5,6	30	71
Lipase B	<u>Rhizopus delemar</u>	5,6	40	71
Lipase C	<u>Rhizopus delemar</u>	5,6	35	71
Lipase	<u>Mucor hiemalis</u>	7,0	25	2
Lipase	<u>Penicillium cyclopium</u> M.	6,0	40	175
Lipase	<u>Achromobacter lipolyticum</u>	7,0	37	91
Lipase	<u>Candida deformans</u>	7,0	40 - 50	154
Lipase	<u>Rhodotorula pilimanae</u> I	4,0	45 - 50	155
Lipase	<u>Rhodotorula pilimanae</u> II	7,0	45 - 50	155
Lipase	<u>Aspergillus oryzae</u>	7,0	45	7

FIGURA 10A - Efeito do pH na Estabilidade de Lipase Bruta.

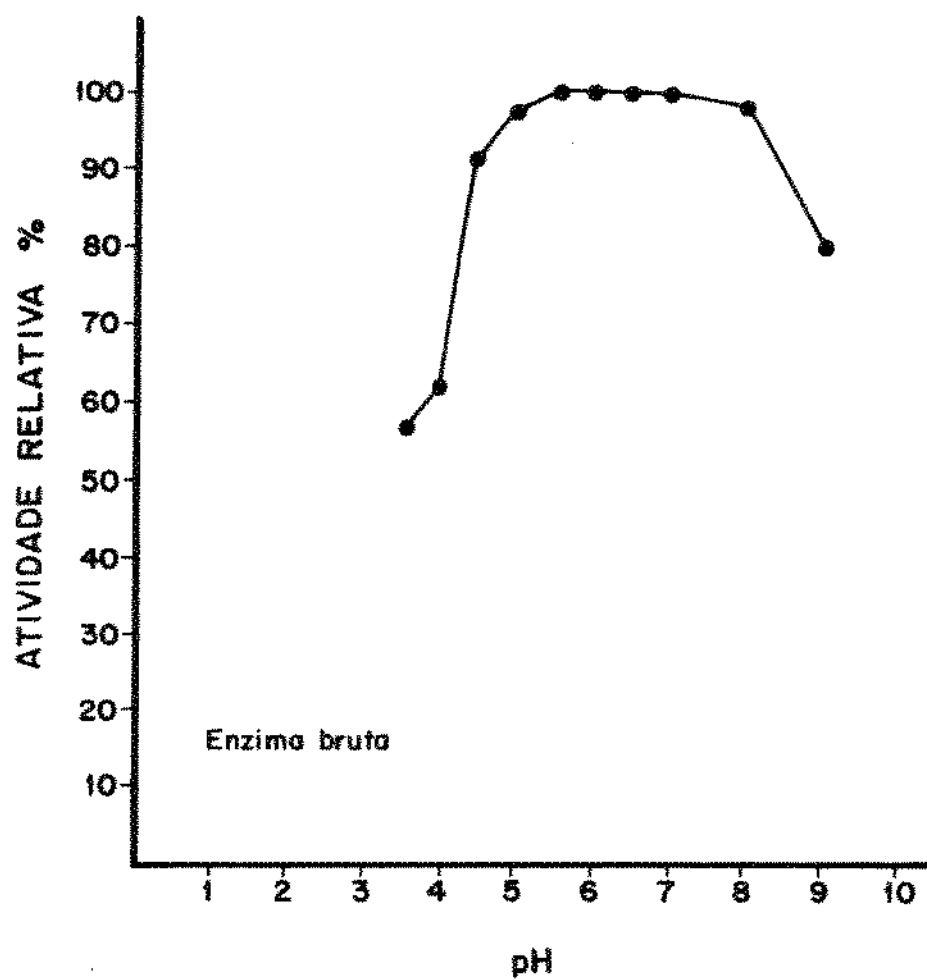
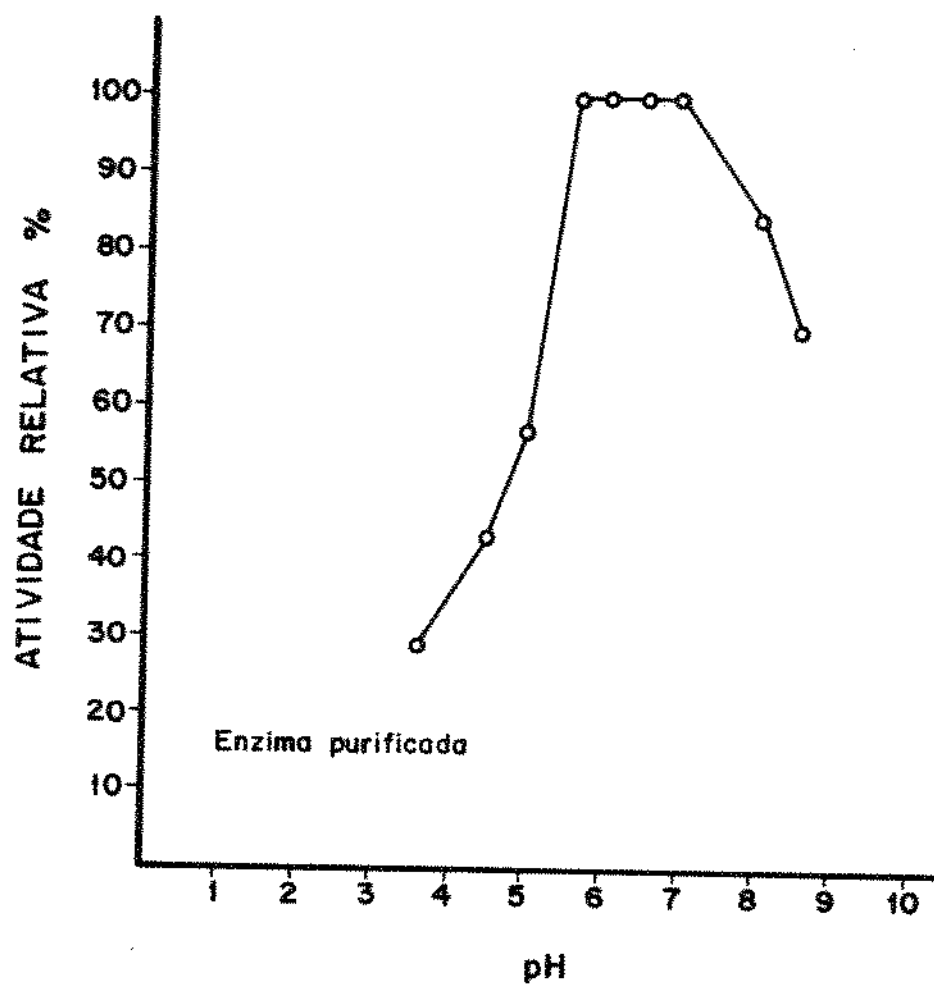


FIGURA 10B - Efeito do pH na Estabilidade de Lipase Purificada.



apresentaram pH de estabilidade de 3,0 a 8,0 para lipase A, 4,0 a 7,0 para lipase B e C, após 15 horas de incubação a 30°C.

A lipase produzida por Penicillium cyclopium M., descrita por OKUMURA et alii (175) apresentou pH de estabilidade de 4,0 a 6,0, após 16 horas de incubação a 27°C.

ISHIHARA et alii (66) verificaram que a lipase produzida por Mucor javanicus apresentou pH de estabilidade 4,5 a 8,0 após tratamento por 24 horas a 6°C.

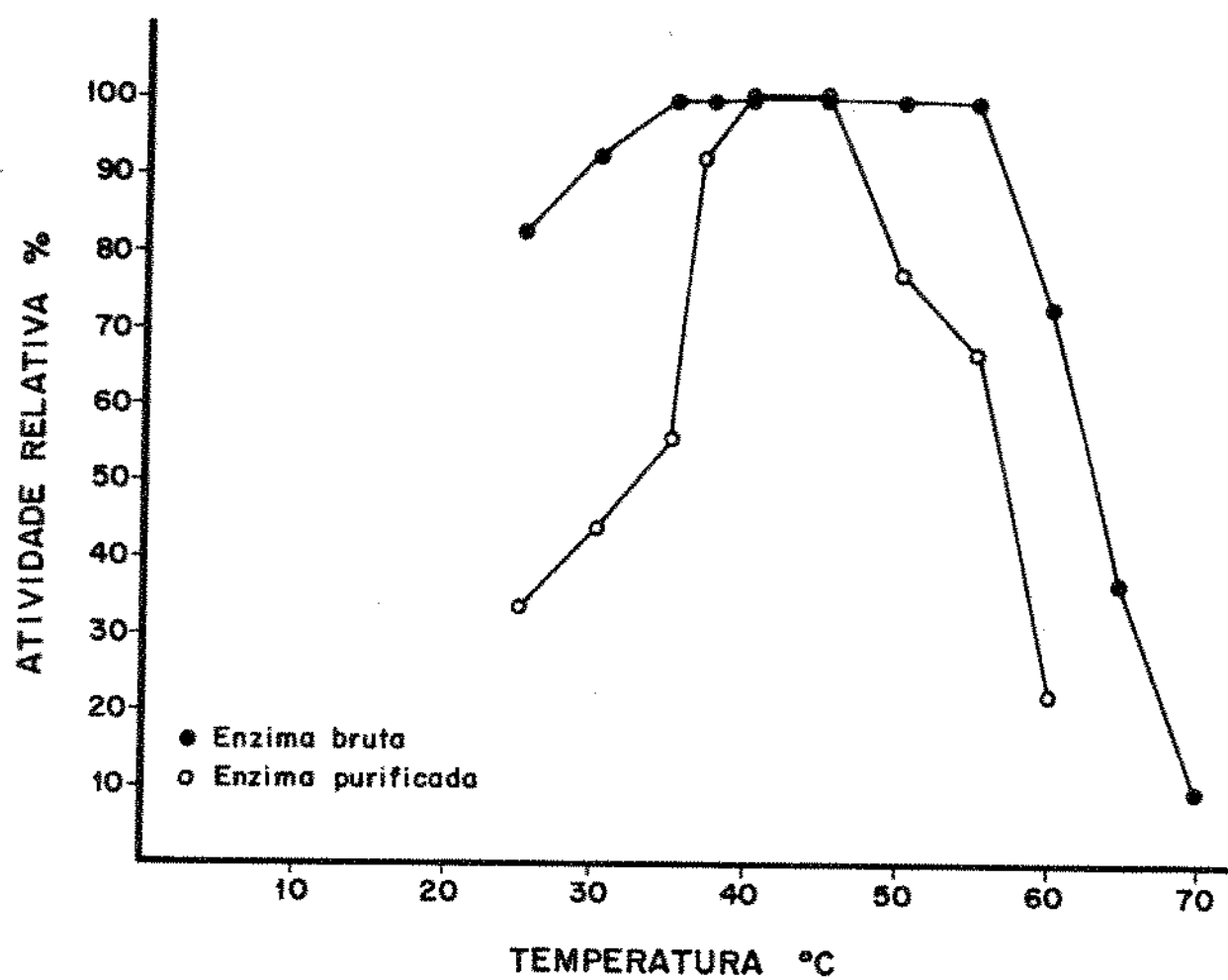
A lipase de Mucor miehei estudada por MOSKOWITZ et alii (153) mostrou-se estável na faixa de pH entre 4,0 e 9,0 e instável a pH abaixo de 4,0 após 4 horas de incubação à temperatura ambiente.

4.5.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade de lipase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.3. A Figura 11 mostra que a lipase de Trichoderma sp N° 817 purificada apresenta atividade ótima entre 40 e 45°C. Este resultado indica que a enzima apresenta atividade ótima na mesma faixa de temperatura de lipases fúngicas descritas por MOSKOWITZ et alii (153); OKUMURA et alii (175).

A lipase bruta de Trichoderma sp apresentou temperatura ótima na faixa de 35 a 55°C. A presença de impurezas nesta preparação bruta pode exercer algum tipo de proteção contra a perda de atividade pelo aquecimento do sistema de reação.

FIGURA 11 - Efeito da Temperatura na Atividade de Lipase Bruta e Purificada.



A Tabela 3 mostra a temperatura ótima de atividade de lipases microbianas de diferentes origens descritas na literatura.

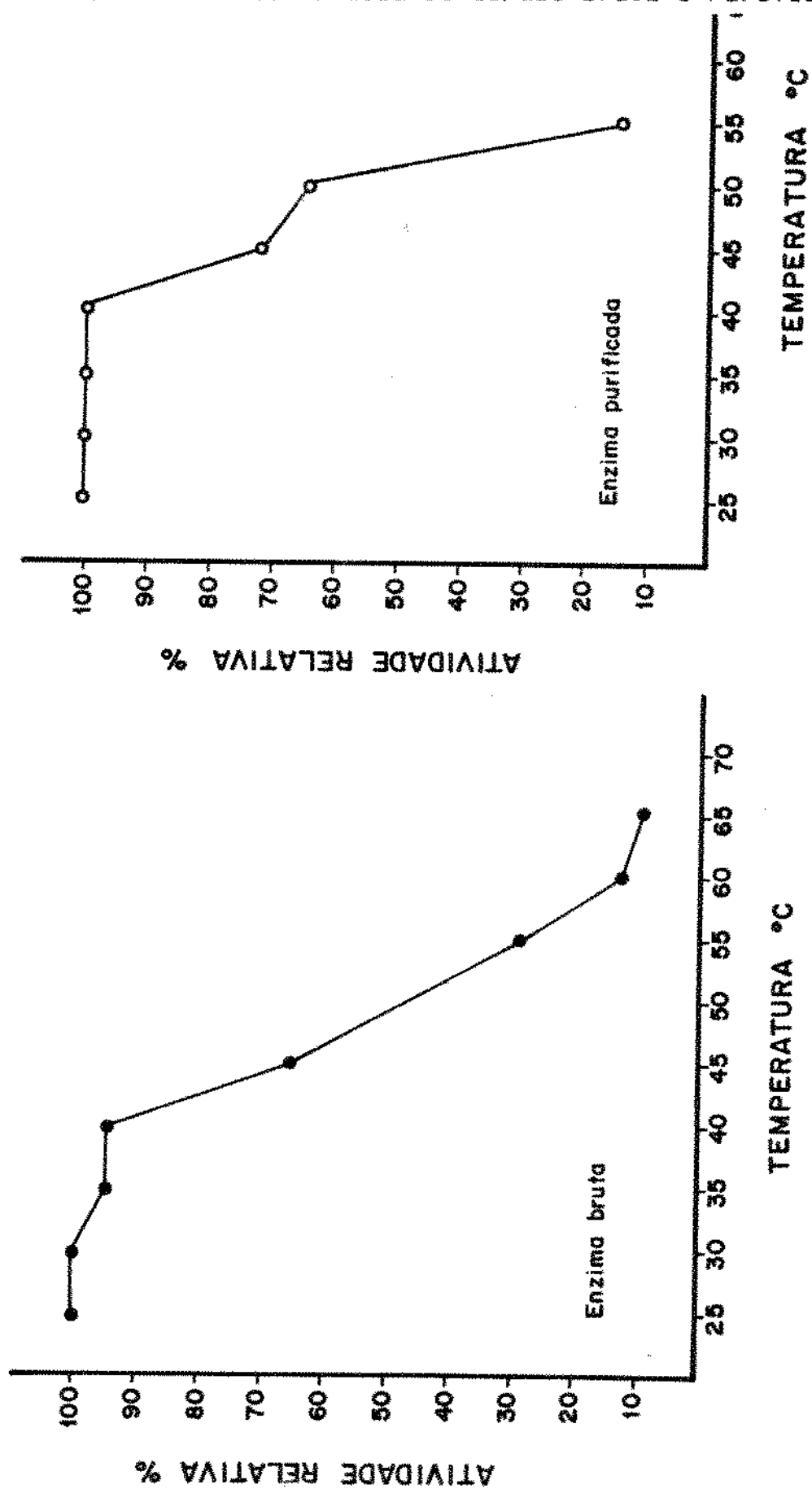
4.5.4. Estabilidade térmica da enzima

O estudo referente ao efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.6.4. A Figura 12 ilustra os resultados. A incubação da lipase purificada e da lipase bruta de Trichoderma sp N° 817 nas temperaturas de 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C durante 1 hora na ausência de substrato resultaram em inativação significativa de 56% para a enzima bruta e 28% para enzima purificada à temperatura de 45°C.

Dentre as lipases fúngicas descritas por TSUJISAKA et alii (242) as lipases produzidas por Aspergillus niger, Rhizopus delemar (A), Geotrichum candidum e Penicillium cyclopium apresentaram termoestabilidade a 50, 65, 45, 50 e 40°C respectivamente quando tratadas por 15 minutos em pH 5,6.

EINTENMILLER et alii (35) determinaram a estabilidade térmica da lipase de Penicillium roqueforti em solução aquosa em pH 6,5. A enzima perdeu cerca de 65% de sua atividade em 60 minutos a 40°C. A enzima foi completamente inativada a 50°C dentro de 10 minutos. No entanto, esta lipase parece ser estável à baixas temperaturas podendo ser mantida a 0°C sem perda de atividade por longos períodos.

FIGURA 12 - Estabilidade Térmica da Lipase Bruta e Purificada.



TSUJISAKA et alii (243) estudaram a termoestabilidade da lipase produzida por Geotrichum candidum Link verificando que a enzima foi estável a temperaturas abaixo de 55°C.

A lipase bacteriana produzida por Achromobacter lipolyticum estudada por KHAN et alii (91) mostrou ser altamente termorresistente pois somente 47% de sua atividade foi perdida sob aquecimento a 71°C por 180 minutos, a enzima foi completamente inativada quando aquecida a 99°C por 40 minutos.

LU & LISKA (131) observaram que a lipase de Pseudomonas fragi apresenta termorresistência pois perde apenas 27,1% de atividade após aquecimento a 62°C por 1 hora, sendo porém completamente inativada quando submetida a 66°C por 1 hora ou a 71°C por 10 minutos.

4.3.5. Efeito de sais minerais e outros compostos na atividade enzimática

O efeito de sais minerais e outros compostos na atividade de lipase foi testado de acordo com as condições descritas no item 3.2.6.5. utilizando-se o substrato paranitrofenilaurato para verificar a interferência de sais minerais e outros compostos na atividade enzimática.

Verificou-se que $ZnSO_4$ e $AgNO_3$ na concentração de 1mM em relação ao volume final de mistura de reação, não afetaram significativamente a atividade de lipase da linhagem de Trichoderma sp N° 817. A atividade de lipase foi fortemente inibida na presença de $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ na concentração de

1 mM de sal em relação ao volume final da reação. Os sais KCl , $CaCl_2$ e $NiSO_4$ inibiram moderadamente a atividade de lipase de Trichoderma sp. A Tabela 4 apresenta os resultados.

Em contrapartida, TSUJISAKA et alii (242) relataram que as lipases fúngicas de Aspergillus niger, Rhizopus delemar, Geotrichum candidum e Penicillium cyclopium foram ativadas por íon cálcio. Foi verificado que a lipase de Aspergillus niger quando na presença de $CaCl_2$ foi ativada pelo íon cálcio na mistura de reação. A ativação, entretanto, não foi observada no começo da reação enzimática indicando ser necessário acumular uma certa quantidade de ácido oleico para induzir a ativação. Este efeito foi comprovado quando foi adicionado íon cálcio após ter acumulado ácido oleico no curso da hidrólise de óleo de oliva pela enzima. A reação foi rapidamente acelerada. O autor considera que o efeito da adição de cálcio parece ser devido ao aumento do estado de emulsificação da mistura pela formação de sais de cálcio com os ácidos graxos livres.

A lipase de Trichoderma sp. linhagem Nº 817 foi fortemente inibida na presença dos íons Fe^{++} . Este resultado está de acordo com os dados relatados por TSUJISAKA et alii (242) que verificaram que o efeito inibitório do íon Fe^{++} foi o mais severo para as 4 lipases fúngicas estudadas.

NAGAOKA & YAMADA (159) verificaram que a lipase de Mucor lipolyticus Aac-0102 que foi separada em duas frações F_{2A} e F_{2B} sofreram inibição de atividade de forma similar pelos íons de metal pesado como Ag^+ e Hg^{++} .

Tabela 4 - Efeito de sais minerais na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenillaurato

Composto concentração	% de atividade relativa Atividade sobre p-nitrofenillaurato	
	1 mM	10 mM
ZnSO ₄	96,0	33,3
MgSO ₄	71,4	57,2
MnSO ₄	71,4	57,2
KCl	86,0	86,0
CaCl ₂	85,7	57,1
FeSO ₄	51,0	----
NiSO ₄	85,7	28,7
AgNO ₃	93,2	44,4

KHAN et alii (91) observaram que a lipase de Achromobacter lipolyticum foi estimulada pela presença de Mg^{++} , Na^{+} , K^{+} , Ca^{++} , sendo o $MgCl_2$ de maior poder de ativação dentre os sais testados e $CaCl_2$ o de menor poder de ativação.

OKUMURA et alii (175) verificaram que a lipase II de Penicillium cyclopium M₁ não teve sua atividade afetada por íons Ca^{++} quando agia sobre monoacilglicerol, ésteres metílicos de ácidos graxos, etc.

O efeito de outros compostos sobre a atividade enzimática da lipase de Trichoderma sp linhagem Nº 817 foi determinado de acordo com item 3.2.6.5. A Tabela 5 ilustra os resultados. Verificou-se que o agente tensoativo Triton X-100 na concentração de 10mM em relação ao volume final da mistura de reação, não inibe a atividade de lipase de Trichoderma sp linhagem Nº 817. Em contrapartida o sal biliar desoxicolato de sódio, ácido linoleico, ácido láurico, ácido oleico e ácido butírico na concentração de 10mM em relação ao volume final do sistema de reação, inibem severamente a atividade enzimática.

YAMAGUCHI et alii (257) estudando as propriedades da lipase de Chromobacterium viscosum verificaram ser ela estimulada por alta concentração de sal biliar, característica similar à lipase pancreática. A inibição da lipólise por ácidos graxos pode ser devido a seu acúmulo na interface entre o substrato e a enzima hidrossolúvel impedindo a hidrólise (74). Assim a adição de íons Ca^{++} pode evitar a inibição da hidrólise formando soluções insolúveis com o ácido graxo livre.

Tabela 5 - Efeito de alguns compostos na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenillaurato.

Reagente	Concentração (mM)	% Atividade Relativa
Triton X-100	10	100
Desoxicolato de sódio	10	42,85
Ácido oleico	10	14,2
Ácido linoleico	10	28,6
Ácido laurico	10	28,6
Ácido n-bulírico	10	14,2

4.5.6. Efeito de inibidores na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade de lipase de Trichoderma sp Nº 817, foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.6.6., utilizando-se o substrato paranitrofenilaurato para se verificar a interferência dos reagentes na determinação da atividade enzimática. A Tabela 6 ilustra os resultados. Verificou-se que os reagentes p-cloromercuribenzoato, iodoacetamida e bissulfito de sódio na concentração de 1mM em relação ao volume final da mistura de reação, inibiram moderadamente a atividade lipolítica. Mercaptoetanol na concentração de 1mM não exerceu efeito sobre a atividade enzimática. Cisteína na concentração de 1mM em relação ao volume final da mistura de reação inibiu severamente a atividade enzimática, indicando que a lipase de Trichoderma sp requer ponte disulfeto (S-S) intacta para atividade.

A lipase de Mucor pusillus (223) apresentou resultados opostos, pois a atividade enzimática não foi afetada nem por agentes redutores (cisteína, 2-mercaptoetanol) nem por agentes quelantes.

A lipase produzida por Candida deformans (154) foi inibida pelos clássicos reagentes ligadores de grupos tiol como p-cloromercuribenzoato (PCMB) e iodoacetamida, indicando que o sítio ativo desta lipase deve conter grupo SH.

Tabela 6 - Efeito de inibidores de enzimas na atividade de lipase sobre o substrato p-nitrofenillaurato.

Reagente	Concentração (mM)	% Atividade Relativa
p-cloromercuribenzoato	1	85,7
Cisteína	1	14,3
Iodoacetamida	1	85,7
Bissulfito de sódio	1	71,6
Mercaptoetanol	1	100,0

4.5.7. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática

O efeito da concentração dos substratos 1(3)-monoleína, 1,2(1,3)-dioleína e paranitrofenilaurato na atividade de lipase de Trichoderma sp N° 817 foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.6.7. Os resultados estão ilustrados respectivamente nas Figuras 13, 14 e 15, nos gráficos de MICHAELIS-MENTEN e LINEAWER & BURK. A constante de MICHAELIS-MENTEN (k_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de LINEAWER & BURK (126) obtendo-se os valores de k_m 0,78 mmoles e V_{max} 3,85 μ moles de paranitrofenol/minuto/mg de proteína para o substrato paranitrofenilaurato.

Os valores de k_m 0,185 mmoles e V_{max} 0,42 μ moles de ácido oleico/minuto/mg de proteína foram encontrados para o substrato 1(3)-monoleína e os valores de k_m 0,25 mmoles e V_{max} 0,71 μ moles ácido oleico/minuto/mg de proteína para o substrato 1,2(1,3)-dioleína.

VAUGHAN et alii (250) estudando a atividade lipolítica em tecido adiposo de rato relatou a presença de uma lipase com alto grau de especificidade para monoglicerídeos não sendo regulada pelo sistema hormonal.

KHOO & STEINBERG (94) relataram a presença de atividade de diglicerídeo e monoglicerídeo lipase na fração de lipase do tecido adiposo de galinha.

TORNQUIST & BELFRAGE (238) ao purificar monoacilglicerol lipase de tecido adiposo de rato constatarem

FIGURA 13 - Efeito da Concentração do Substrato 1(3)-Monoleína na Atividade de Lipase.

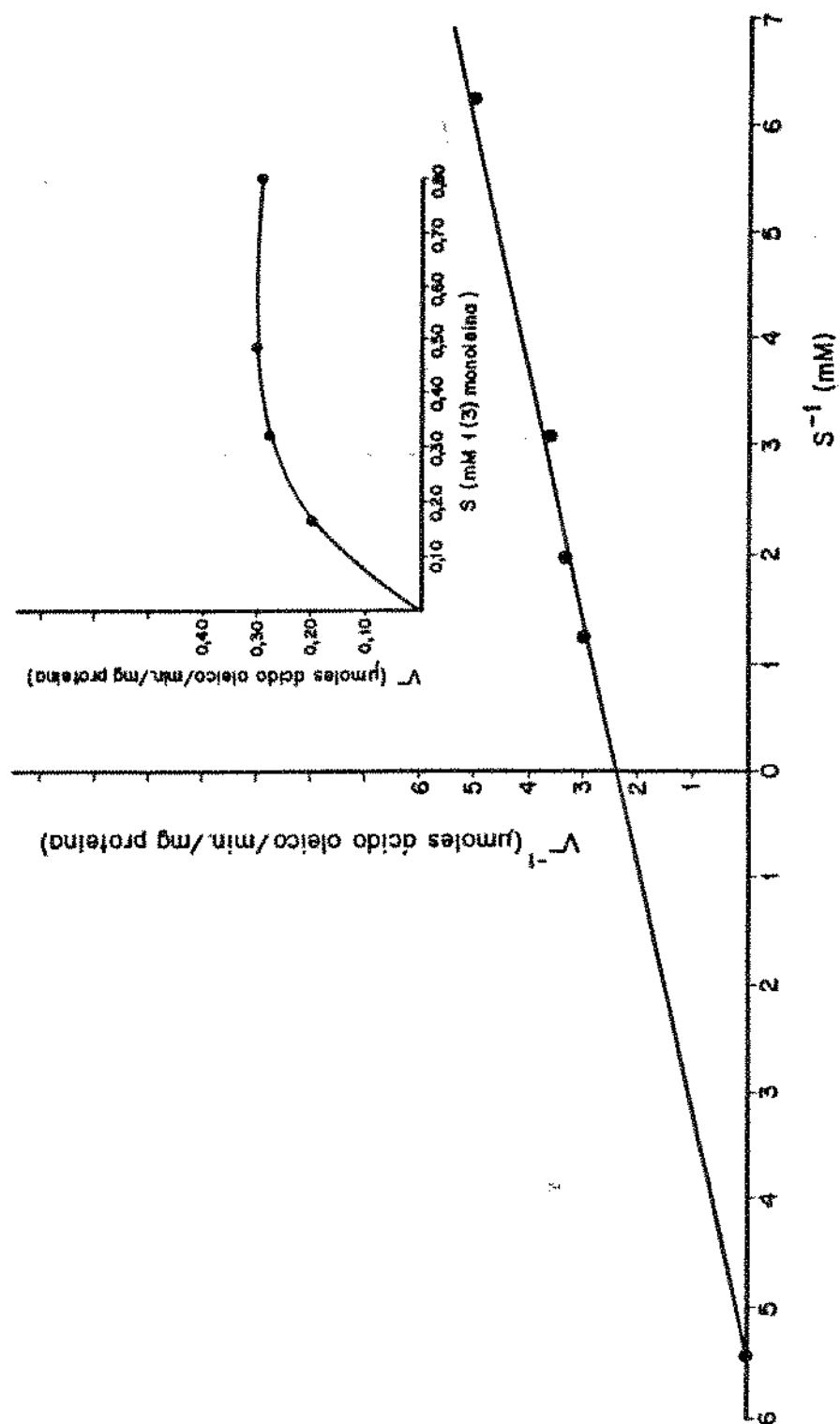


FIGURA 14 - Efeito da Concentração do Substrato 1,2(1,3)-Dioleína na Atividade de Lipase.

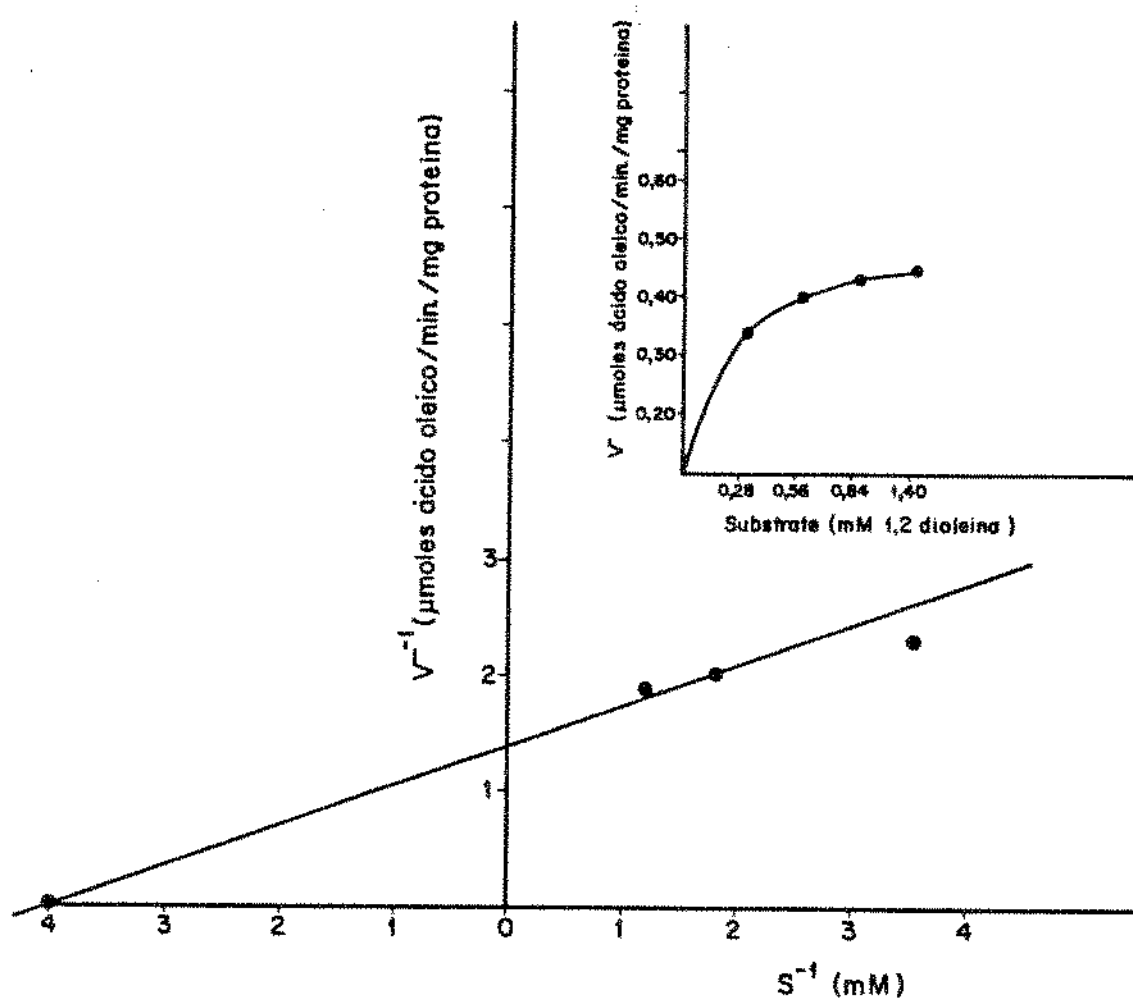
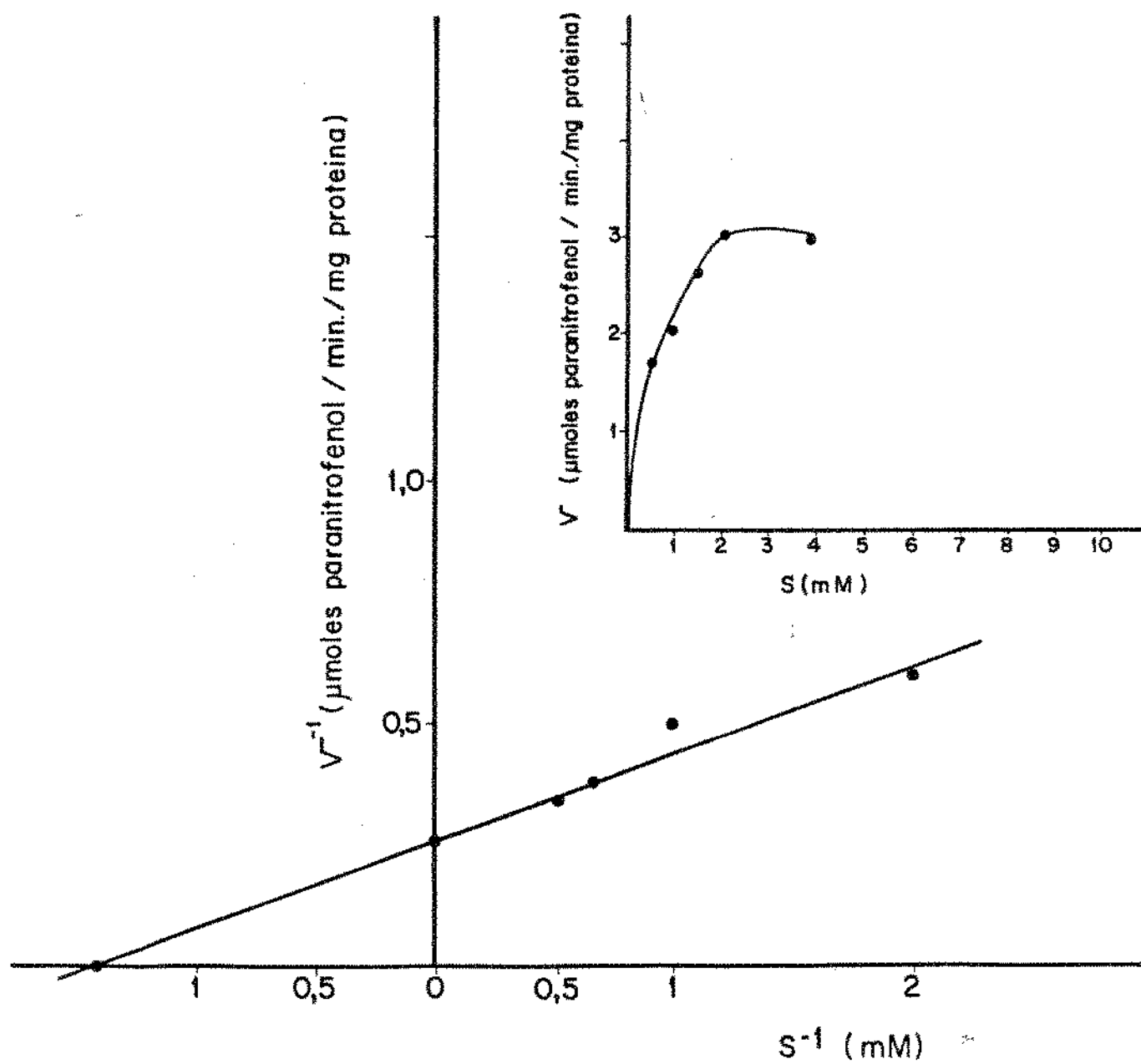


FIGURA 15 - Efeito da Concentração do Substrato Paranitrofenil-laurato na Atividade de Lipase.



que esta enzima hidrolisava 2-monoleil glicerol à mesma taxa que 1(3)-monoleilglicerol, não tendo atividade contra dioleilglicerol.

BERGLUND et alii (17) relataram a presença de monoglicerídeo lipase em tecido adiposo de galinha que quando purificada apresentou atividade sobre o substrato monoleína 3,5 vezes superior em relação à dioleína.

Os resultados obtidos indicam que a lipase de Trichoderma sp N° 817 apresenta maior afinidade para o substrato 1(3)-monoleína do que 1,2(1,3)-dioleína. Com relação à trioleína os dados prévios encontrados quando da seleção do microrganismo já indicavam a muito baixa afinidade da lipase por este substrato.

4.5.8. Hidrólise de glicerídeos pela lipase de Trichoderma sp

A hidrólise de glicerídeos pela lipase de Trichoderma sp. foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.7. As porcentagens de hidrólise estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

A enzima hidrolisou 27,6% de 1(3)-monoleína após 20 horas de incubação, enquanto hidrolisou apenas 3,45% de trioleína (principal triglicerídeo presente no óleo de oliva) após 20 horas de incubação. O glicerídeo monolaurato foi hidrolisado a taxa menor comparativamente à 1(3)-monoleína.

A lipase de Trichoderma sp linhagem N° 817 hidrolisou aproximadamente 1,3 vezes mais 1(3)-monoleína do que 1,2(1,3)-dioleína e cerca de 10 vezes mais do que trioleína.

Tabela 7 - Porcentagem de hidrólise de glicerídeos pela lipase de Trichoderma sp.

Substratos	Tempo de incubação (Horas)			
	2	4	6	20
Trioleína	1,5	1,5	2,0	3,45
1(3)-Monoleína	13,5	16,5	19,6	27,6
1(3)-Monolaurato	5,3	5,7	10,1	10,0

Tabela 8 - Hidrólise de glicerídeos pela lipase de Trichoderma
sp.

Substrato X	Tempo de incubação (horas)		
	2	6	20
1(3) Monoleína	13,6	21,4	30,6
1,2(1,3)-Dioleína	5,28	8,3	18,5
Trioleína	1,5	2,0	3,45

A Figura 16A, demonstra a porcentagem de hidrólise dos substratos 1(3)-monoleína; 1(3)-monolaurato e óleo de oliva pela lipase de Trichoderma sp.

A Figura 16B, mostra a cromatografia em camada delgada (TLC) da ação hidrolítica da lipase de Trichoderma sp sobre os substratos puros 1(3)-monoleína e trioleína.

Não se observa nos cromatogramas concentração de ácido oleico liberado pela fraca hidrólise de trioleína.

A Figura 17, mostra a cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise da monoleína comercial pela lipase de Trichoderma sp após 0, 2, 4 e 6 horas de reação. Pode-se verificar a diminuição gradual de monoglicerídeo com o passar do tempo de reação enquanto que "spots" correspondentes à trioleína permanecem inalterados com o passar do tempo de reação.

A Figura 18, mostra a cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise dos glicerídeos trioleína, 1,2(1,3)-dioleína e 1(3)-monoleína comercial após 20 horas de reação com lipase de Trichoderma sp.

IWAI et alii (70) compararam as propriedades de duas lipases de Penicilium cyclopium Westring, verificando que a lipase B apresentou maior atividade contra éster de ácido oleico enquanto que a lipase A apresentou baixa atividade contra este substrato.

OKUMURA, IWAI & TSUJISAKA (175) purificaram lipase de Penicillium cyclopium M. encontrando 2 frações principais. A Fração II apresentou alta atividade contra o éster metillaurato

FIGURA 16A - Porcentagem de Hidrólise dos Substratos 1(3)-Monoleína, 1(3)-Monolaurato e óleo de Oliva pela Lipase de *Trichoderma* sp.

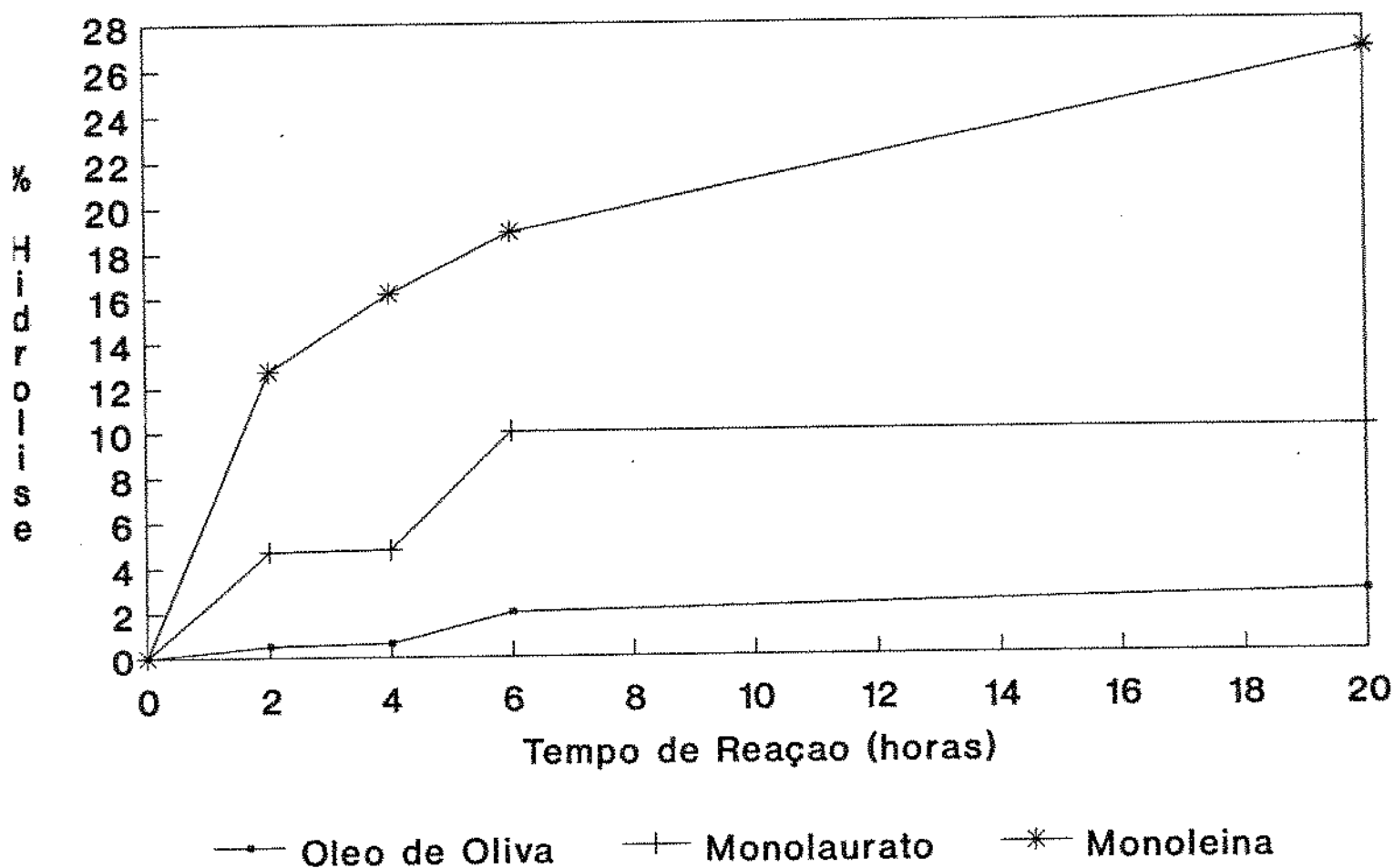


FIGURA 16B - Hidrólise de Monoleína e Trioleína pela Lipase de Trichoderma sp.

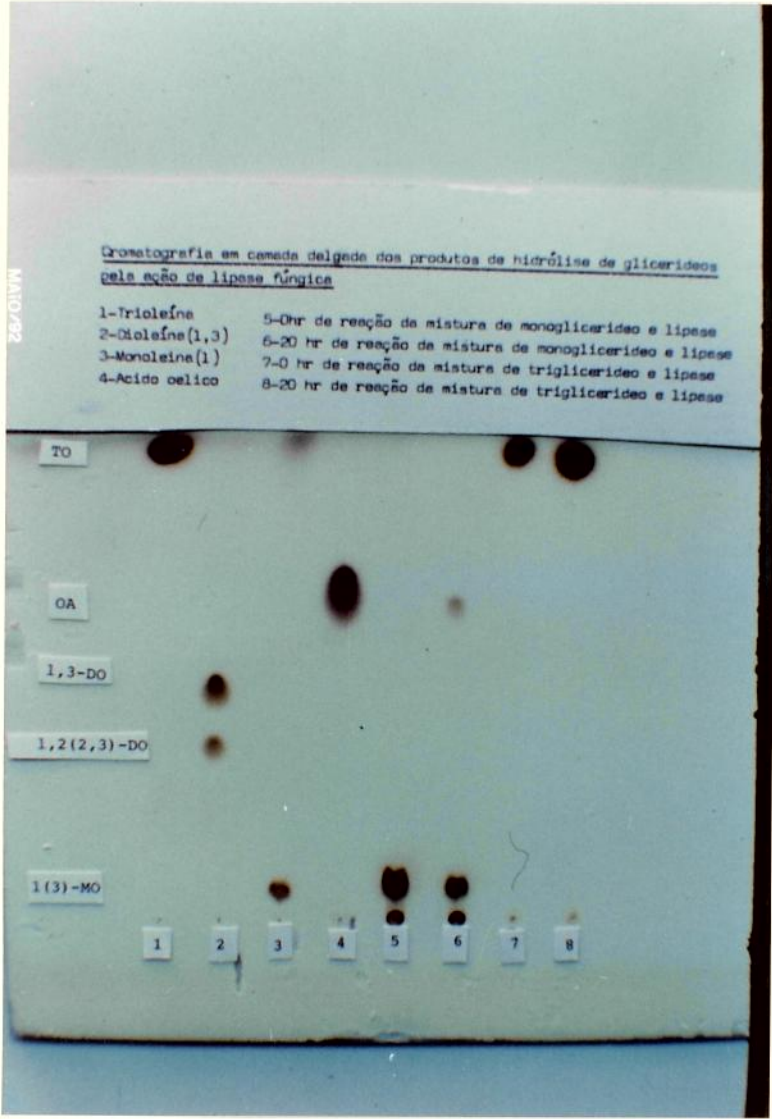


FIGURA 17 - Hidrólise de Monoleína Comercial por Lipase de Trichoderma sp.

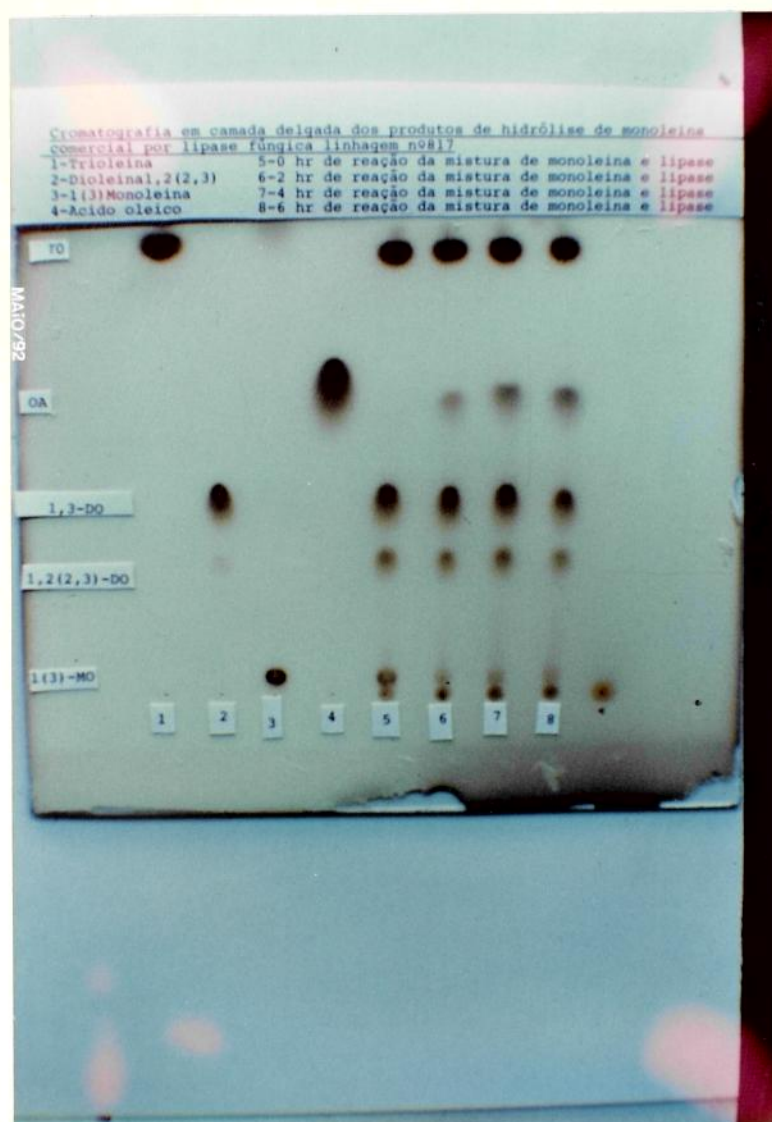
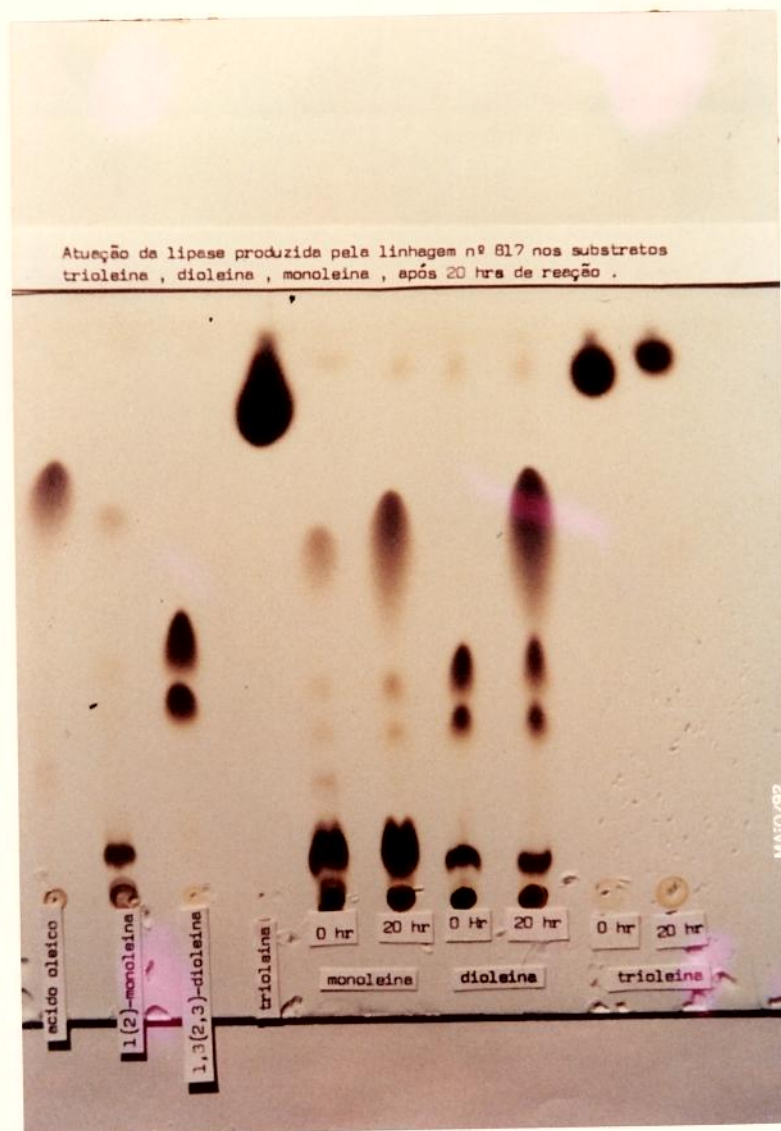


FIGURA 18 - Atuação da Lipase de Trichoderma sp. nos Substratos Trioleína, Dioleína e Monoleína após 20 horas de Reação.



e baixa atividade contra óleo de oliva. Esta fracção não hidrolisou mais do que 20% de trioleína apesar da grande quantidade de enzima utilizada. A lipase de Trichoderma sp linhagem Nº 817 assemelha-se a lipase descrita, pois assim como ela, não hidrolisa somente monoacilglicerol mas também diacilglicerol e ésteres de ácido graxo. No entanto, difere desta com relação à hidrólise do substrato paranitrofenilaurato. A lipase de Trichoderma sp apresenta alto grau de hidrólise deste substrato enquanto que a de Penicillium cyclopium Fracção II não hidrolisa paranitrofenilaurato. Os autores designaram esta lipase como parcial glicerideo hidrolase.

4.5.9. Determinação de carboidratos totais presentes na lipase purificada

O teor de carboidratos totais presente na lipase de Trichoderma sp linhagem Nº 817 foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (33), sendo encontrado o conteúdo de 7,75% de carboidratos totais.

TSUJISAKA et alii (243) estimaram o conteúdo de carboidratos da lipase purificada de Geotrichum candidum, encontrando o valor de 7,5% de carboidratos como manose, parecendo ser este o principal componente dentre os açúcares detectados.

ISHIHARA et alii (66) encontraram o teor de 2,6% de carboidrato na lipase purificada de Mucor javanicus.

O conteúdo de carboidratos das lipases purificadas I e II de Aspergillus niger foi estimado por HOFELMANN et alii (58) ser 6 e 9% respectivamente, verificando-se alto teor de manose de ambas as lipases.

4.6. Estudo da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases microbianas combinadas

O estudo da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases microbianas combinadas foi realizado de acordo com o método descrito em 3.2.10.

4.6.1. Efeito da concentração das lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva

O efeito da concentração das lipases comerciais Lipase G (Penicillium sp.), Lipase N (Rhizopus niveus) e Lipase Can (Geotrichum candidum), foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.2).

Os resultados estão descritos na Tabela 9, a partir dos valores obtidos foram estimados os números de unidades das diversas lipases mais adequados para utilização nos sistemas de reação para hidrólise de óleo de oliva. Para lipase N (Rhizopus niveus) 6,54 unidades, lipase Geo (Geotrichum candidum) 5,16 unidades, lipase Can (Candida rugosa) 8,22 a 10,28 unidades.

Tabela 9 - Efeito da concentração de lipases em sistemas individuais na hidrólise de óleo de oliva.

Tipo de Lipase	Concentração	
	Unidades/mg de enzima	% Hidrólise
<u>Rhizopus niveus</u>	2,18	13,8
	4,36	24,5
	6,54	28,9
	8,72	29,6
	10,90	30,1
<u>Geotrichum candidum</u>	1,94	16,9
	2,58	19,0
	3,87	27,4
	5,16	33,0
	6,45	32,1
<u>Candida rugosa</u>	1,8	51,9
	8,22	80,1
	10,28	84,0
	12,33	81,3
	14,39	77,8

4.6.2. Hidrólise de óleo de oliva por sistemas de lipases combinadas

A hidrólise de óleo de oliva extravirgem comercial por um sistema de lipases combinadas foi realizado de acordo com o item 3.2.10.3.

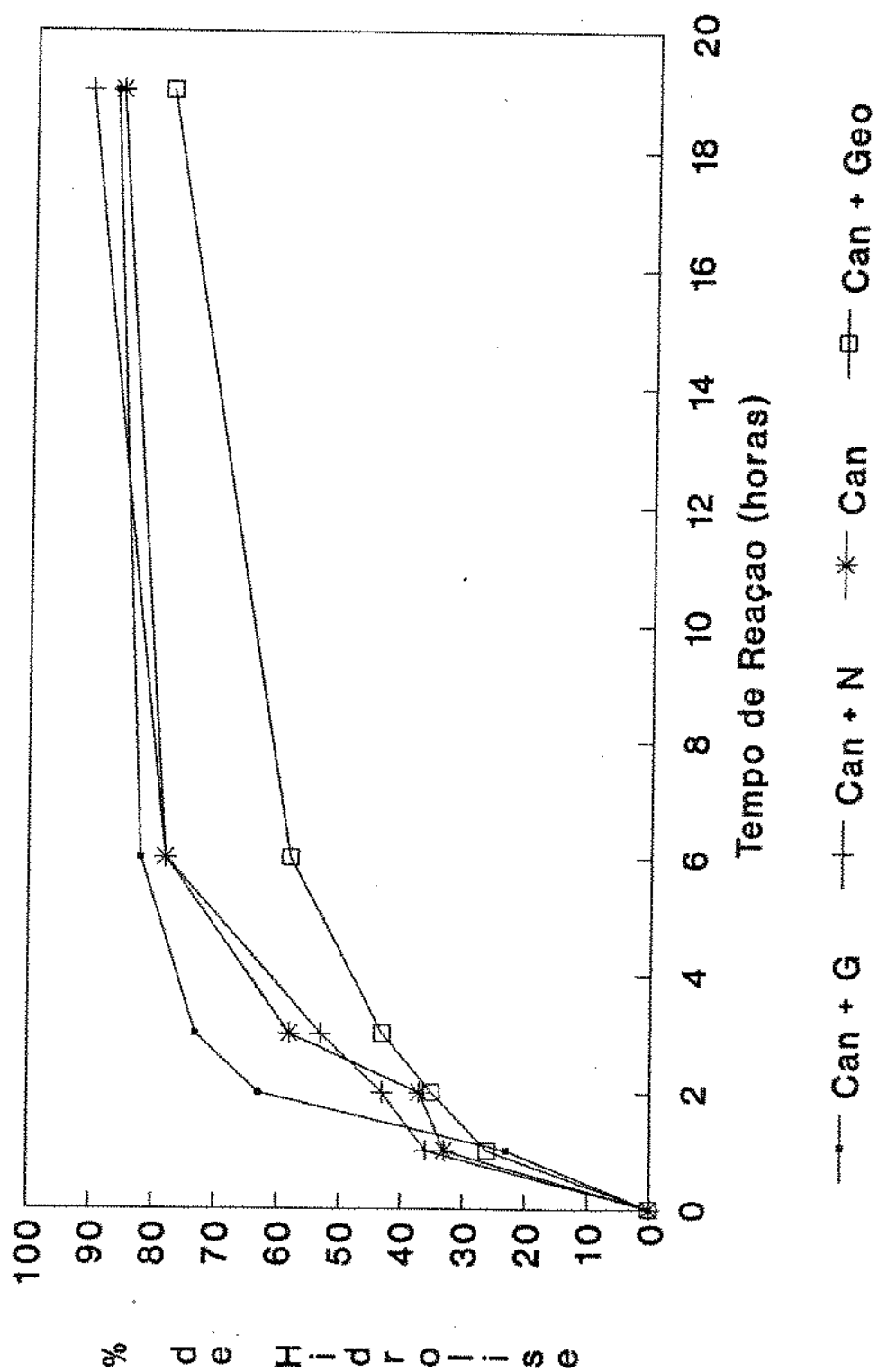
Os resultados ilustrados na Tabela 10 demonstram que após 2 horas de reação a 40°C o sistema combinado Can + G apresentou porcentagem de hidrólise 62,2% enquanto que o sistema com a lipase Can (individual) apresentou a porcentagem de hidrólise de 36,5%, sendo portanto quase 2 vezes maior a porcentagem de hidrólise com enzima individual. A Figura 19 apresenta a porcentagem de hidrólise do óleo de oliva em relação ao tempo de incubação, dos sistemas Can (Can + N), (Can + Geo), (Can + G).

É conhecido que há 2 tipos de processos para a produção de ácidos graxos, o processo físico-químico e o processo enzimático. O processo industrial utilizado atualmente é o processo físico-químico que envolve a utilização de pressão de 700 psi e temperatura de 250°C ou mais alta por um período de 2 horas para obter grau de hidrólise na faixa de 96 a 98% (190). Os ácidos graxos resultantes necessitam ser redestilados para remover sub-produtos e compostos coloridos, portanto os inconvenientes deste processo estão relacionados ao consumo de energia e a produção de reações colaterais como a polimerização de ácidos graxos insaturados e a produção de cetonas e hidrocarbonetos.

Tabela 10 - Porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por Sistema de Lipases Combinadas.

Tipo de Lipase	Tempo (Horas)				
	1	2	3	6	12
Can	33,3	36,5	58,5	68,5	85,7
Can + N	35,3	42,38	53,3	77,0	90,2
Can + Geo	25,5	35,00	41,8	57,8	77,0
Can + G	24,8	62,2	73,3	80,8	79,0

FIGURA 19 - Porcentagem de Hidrólise de óleo de Oliva por Sistema de Lipases Combinadas em Relação ao Tempo de Incubação.



Assim, o processo de hidrólise enzimática pode ser uma alternativa com muitas vantagens como por exemplo a economia de energia e minimização da degradação térmica dos ácidos graxos produzidos. Para que o processo enzimático possa ser otimizado é necessário se conhecer as propriedades físico-químicas da enzima utilizada e o tipo de especificidade quanto ao substrato. É descrito na literatura que lipase pancreática e lipase de Aspergillus niger, Rhizopus delemar e Rhizopus arrhizus (174) exibem especificidade pelas posições 1,3 no triglicerídeo. Tais lipases não podem promover hidrólise completa do triglicerídeo.

Por outro lado as lipases de Candida rugosa, Penicillium cyclopium e Geotrichum candidum são capazes de hidrolisar as três posições dos triglicerídeos produzindo ácidos graxos e glicerol. A lipase de Penicillium roqueforti foi descrita como tendo preferência para hidrolisar a posição 1 do triglicerídeo, mas os estudos não foram conclusivos (ALFORD & PIERCE, 3).

PARK, PASTORE & ALMEIDA (183) descreveram a hidrólise de óleo de soja comercial por um sistema combinado de lipases de Penicillium sp. (G) e lipases de Rhizopus niveus (N) e Rhizopus delemar (D) de tal forma a ter sistemas (G + N) N e (G + D), misturando lipases com especificidade posicional com lipases sem especificidade produzindo 98% de hidrólise após 10 horas de reação enzimática.

4.6.3. Efeito da quantidade de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases

O efeito da quantidade de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases foi determinado de acordo com o item 3.2.10.4., a Tabela 11 demonstra os resultados. Pode ser verificado que na faixa de 2 a 4 ml de tampão acetato pH 5,6 0,05M adicionados no sistema de reação são obtidas as melhores porcentagens de hidrólise para os três sistemas (Can + Geo), (Can + N) e (Can + G), acima ou abaixo destas quantidades há diminuição da porcentagem de hidrólise.

4.6.4. Hidrólise de óleo de oliva por um sistema de lipases combinadas com quantidade de tampão reduzida no sistema de reação

A hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas com quantidade de tampão acetato pH 5,6 0,05M no limite mínimo no sistema de reação foi realizado de acordo com o item 3.2.10.5.

Os sistemas combinados (Can + N) e (Can + G) após 24 horas de incubação apresentaram 96,5 e 97,0% respectivamente de hidrólise do óleo de oliva, consistindo nos melhores sistemas dentre os testados. A Tabela 12 demonstra os resultados obtidos.

Tabela 11 - Efeito da quantidade de tampão na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por um sistema combinado de lipases.

Quantidade em mL de Tampão Aceta- to 0,05M pH 5,6 adicionado	% de Hidrólise		
	Can + Geo	Can + N	Can + G
0	77,0	75,5	58,5
1	80,0	80,3	78,7
2	83,0	83,3	78,7
3	82,0	80,8	80,5
4	83,3	80,5	80,0
5	74,0	71,0	79,5
6	74,3	64,0	79,5
7	74,0	61,5	77,25

Tabela 12 - Hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipases combinadas com teor de tampão reduzido no sistema de reação.

Tipo de Enzima	Tempo de Incubação (Horas) % de Hidrólise					
	1/2	2 1/2	4	18	24	28
Can	31,5	70,3	75,0	85,6	88,2	89,1
Can + Geo	19,7	66,2	78,5	90,0	91,0	91,5
Can + N	24,1	67,0	72,9	90,0	96,5	96,6
Can + G	28,5	75,3	73,0	93,8	97,0	98,8

4.6.5. Efeito da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de *Candida rugosa*

O estudo do efeito da concentração de substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de *Candida rugosa* foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.6.

A Tabela 13 descreve os dados de porcentagem de hidrólise do óleo de oliva em relação à concentração de óleo de oliva presente no sistema de reação, as quantidades de 1 e 2 g de óleo de oliva demonstraram ser as mais adequadas para obtenção de maior porcentagem de hidrólise.

4.6.6. Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva

O estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas foi realizado de acordo com o método descrito em 3.2.10.7.

As Tabelas 14, 15 e 16 ilustram os resultados obtidos com os sistemas (Can + N), (Can + G) e (Can + Geo) respectivamente. Verifica-se que aumentando-se a concentração de N, G ou Geo nos sistemas A, B, C respectivamente, permanece praticamente inalterada a porcentagem de hidrólise, sendo fixa a concentração da enzima Can no sistema.

Tabela 13 - Efeito da concentração do substrato na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por lipase de Candida rugosa.

Quantidade de óleo de Oliva (g)	Tempo de incubação (Horas) (% de Hidrólise)				
	1	3	5	7	20
1	37,4	61,5	68,8	77,9	92,4
2	47,5	70,2	80,0	85,3	91,0
3	36,4	66,4	76,2	80,5	80,7
4	23,0	56,7	69,5	74,3	86,8

Tabela 14 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.

Sistema A Can + N (unidades)	Horas de Incubação % de Hidrólise		
	4	8	24
20 + 4,36	75,9	86,5	91,8
20 + 6,54	72,0	84,7	90,6
20 + 8,72	71,0	84,5	90,6
20 + 10,90	70,3	84,6	91,5
20 + 13,0	72,3	83,4	92,0
20 + 15,26	71,8	83,4	90,8

Tabela 15 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.

Sistema B Can + G (unidades)	Horas de Incubação % de Hidrólise		
	4	8	24
20 + 1,6	80,4	87,0	91,0
20 + 3,0	80,3	84,5	90,2
20 + 4,0	78,8	86,9	91,9
20 + 6,2	91,5	89,3	91,7
20 + 8,3	80,7	88,2	91,9
Can 20 unidades	76,9	82,5	88,2

Tabela 16 - Estudo da variação da concentração das lipases utilizadas no sistema de lipases combinadas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva.

Sistema C Can + Geo (unidades)	Horas de Incubação % de Hidrólise		
	4	8	24
20 + 3,87	71,2	83,4	90,4
20 + 5,16	72,5	84,4	90,9
20 + 6,45	70,0	84,4	90,2
20 + 7,74	73,5	84,0	91,8
20 + 9,0	69,8	85,9	90,0

4.6.7. Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzima e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva

Para o estudo da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzima e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva foram utilizados os sistemas (Can + G) e (Can + N) como descrito no item 3.2.10.8.

O dado demonstrado na Tabela 17 indica que o sistema formado pelas lipases Can de Candida rugosa na concentração de 18 unidades de atividade e pela lipase G de Penicillium sp na concentração de 2 unidades de atividade apresentou maior porcentagem de hidrólise de óleo de oliva, obtendo-se 95,9% após 20 horas de incubação, demonstrando um aumento significativo da porcentagem de hidrólise em relação a porcentagem de hidrólise obtida com a enzima Can (Candida rugosa) utilizada em sistema individual.

O sistema formado por lipase de Candida rugosa (Can) e lipase de Rhizopus niveus (N) apresentou 88,3% de hidrólise após 20 horas de reação nas concentrações de 18 unidades de Can e 2 unidades de N, o que representa pouca variação na porcentagem de hidrólise em relação à utilização de apenas lipase de Candida rugosa na concentração de 20 unidades no sistema de reação, onde a porcentagem de hidrólise após 20 horas foi verificada ser 83,5%. A Tabela 18 ilustra os resultados.

As Figuras 20 e 21 ilustram o perfil de hidrólise de óleo de oliva por sistema combinado de lipases (Can + G)

Tabela 17 - Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva

Sistema Can + G (unidades)	Horas de Incubação % de Hidrólise			
	2	4	6	20
20:0	53,4	68,9	76,0	89,6
18:2	55,5	70,9	80,0	95,9
16:4	52,8	69,01	78,6	91,0
14:6	52,0	66,6	76,6	90,8
12:8	51,2	65,3	76,4	91,3
10:10	44,0	60,1	71,6	89,9
8:12	34,9	54,6	64,9	85,0
6:14	22,7	44,8	47,2	81,7
4:16	23,3	38,1	56,0	75,7
0:20	3,8	11,8	13,6	18,5

Tabela 18 - Efeito da variação da proporção das lipases dentro do sistema combinado de enzimas e sua influência na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva

Sistema Can + N (unidades)	Horas de Incubação % de Hidrólise			
	2	4	6	20
20:0	50,6	67,5	73,8	87,5
18:2	45,6	64,3	73,8	88,3
16:4	44,8	61,9	69,8	88,1
14:6	40,8	56,5	66,4	87,4
12:8	41,3	51,9	66,4	87,8
10:10	36,8	49,0	63,8	85,3
8:12	28,1	49,6	59,6	79,80
6:14	34,5	47,8	57,5	81,9
4:16	34,2	38,9	49,8	72,9
0:20	21,5	27,7	30,0	37,9

FIGURA 20 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipase Combinada $\text{Can}_{10} + \text{G}_{12}$, após 2 horas de Reação.

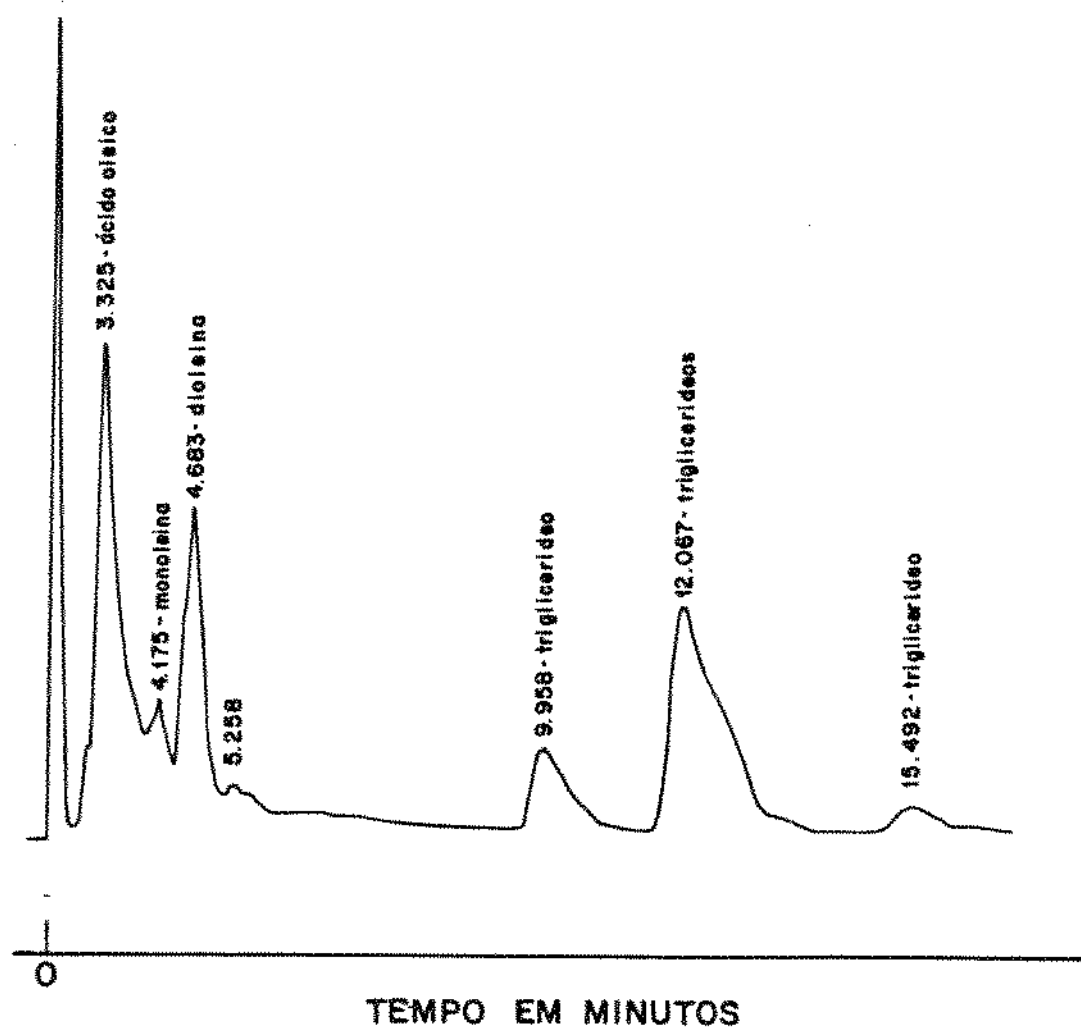
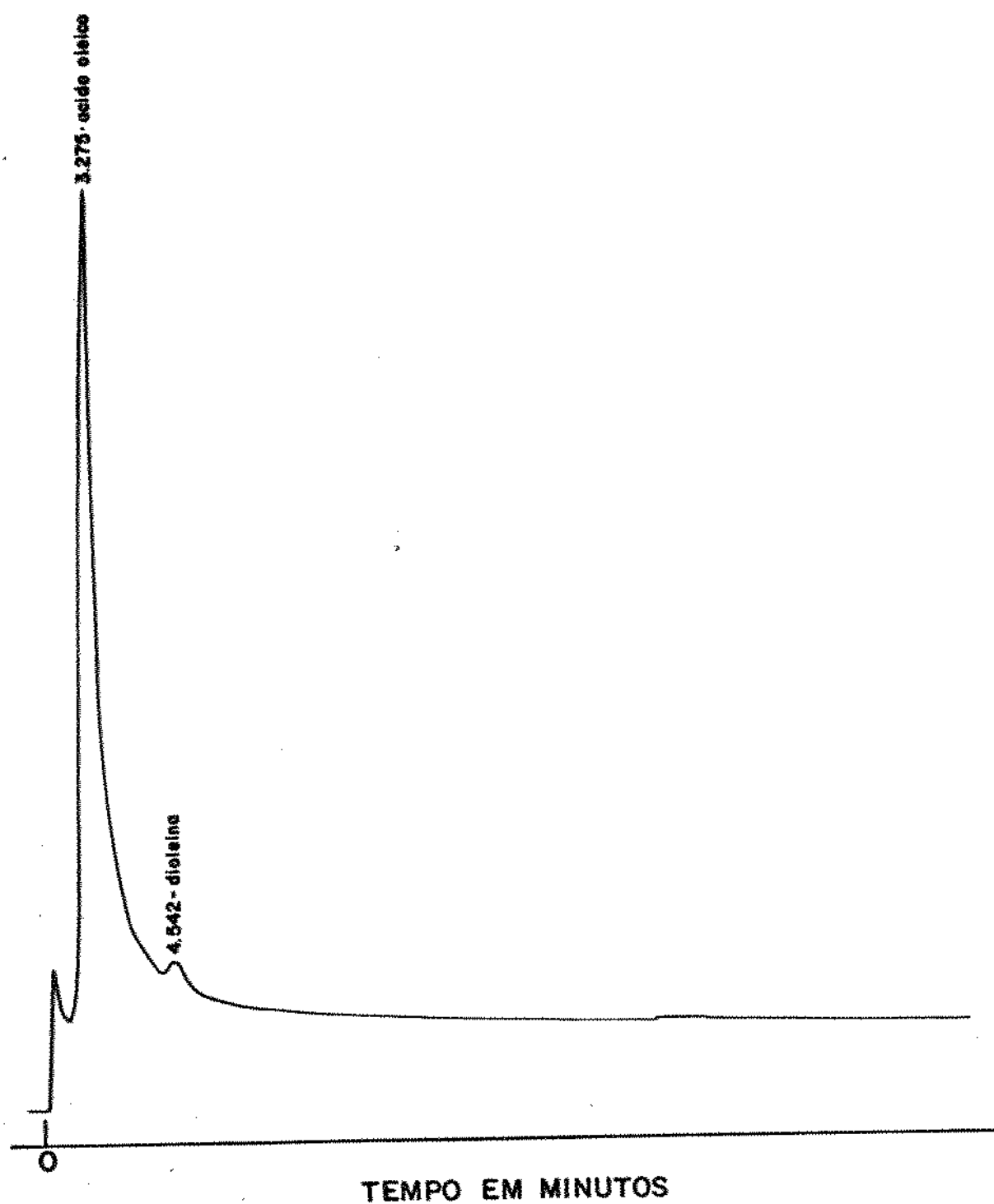


FIGURA 21 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipase Combinada $Ca_{1e} + G_{2e}$, após 20 horas de Reação.



utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com 2 e 20 horas de reação respectivamente. Pode-se visualizar a hidrólise quase que total do óleo de oliva com o desaparecimento dos glicerídeos após 20 horas de reação. As Figuras 22 e 23 demonstram o perfil dos produtos da hidrólise de óleo de oliva por sistema de lipase combinada (Can + N) obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com 2 e 20 horas de reação respectivamente.

McNEIL & YAMANE, em 1991 (148), estudando a obtenção de monoglicerídeos através da glicerólise de óleos e gorduras e utilizando o princípio de sistema de lipases combinadas por PARK et alii (183) testou o sistema combinado de lipase G e lipase SP-398 que é específica para a posição 1,3 do triglicerídeo. A obtenção de monoglicerídeo foi mais alta quando as enzimas foram usadas em combinação do que quando foi utilizado SP-398 sozinha, estes dados podem ser explicados pela forte preferência exibida pela lipase G por monoglicerídeos e diglicerídeos como substrato. Portanto, quando este tipo de lipase é misturada às enzimas que rapidamente hidrolisam triglicerídeo nestes substratos, mais eficiente será o sistema.

FIGURA 22 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipase Combinada $\text{Ca}_{16} + \text{N}_2$, após 2 horas de Reação.

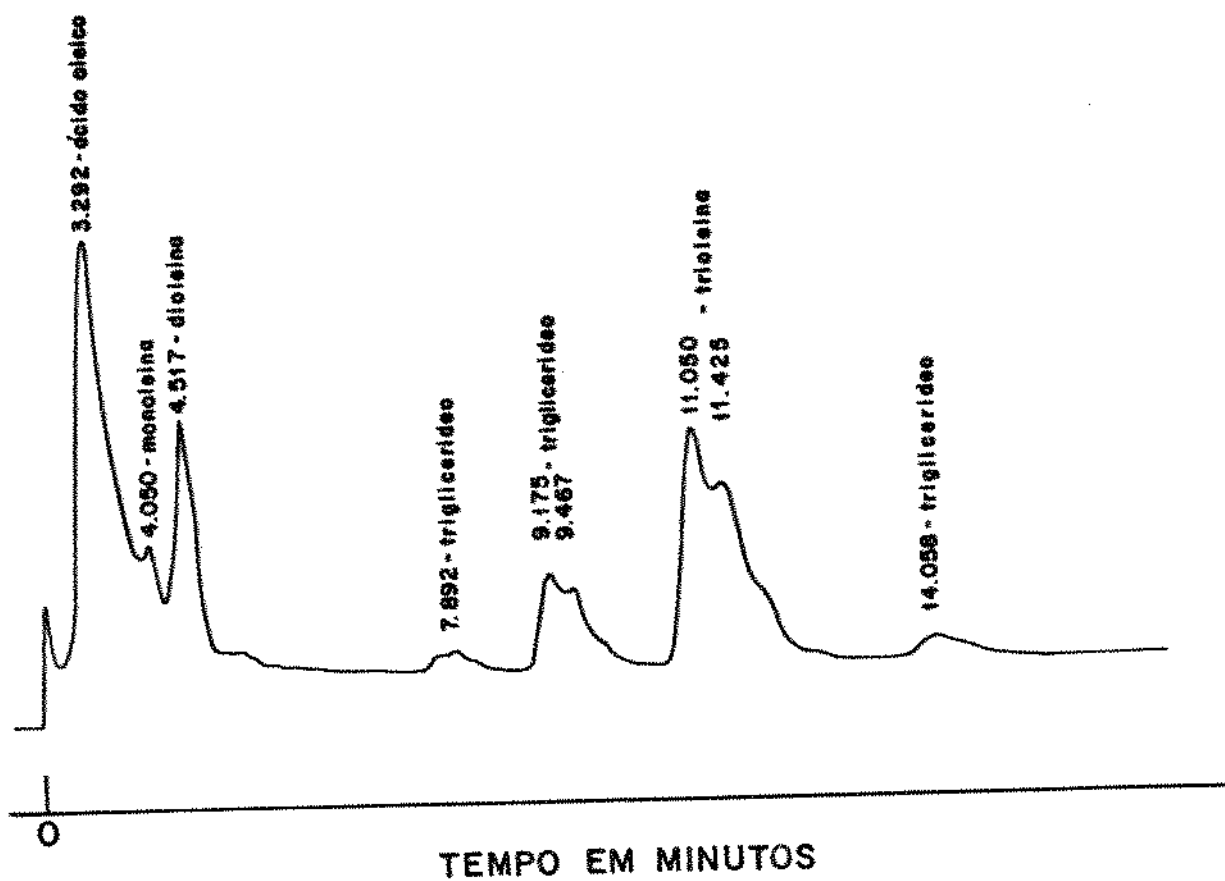
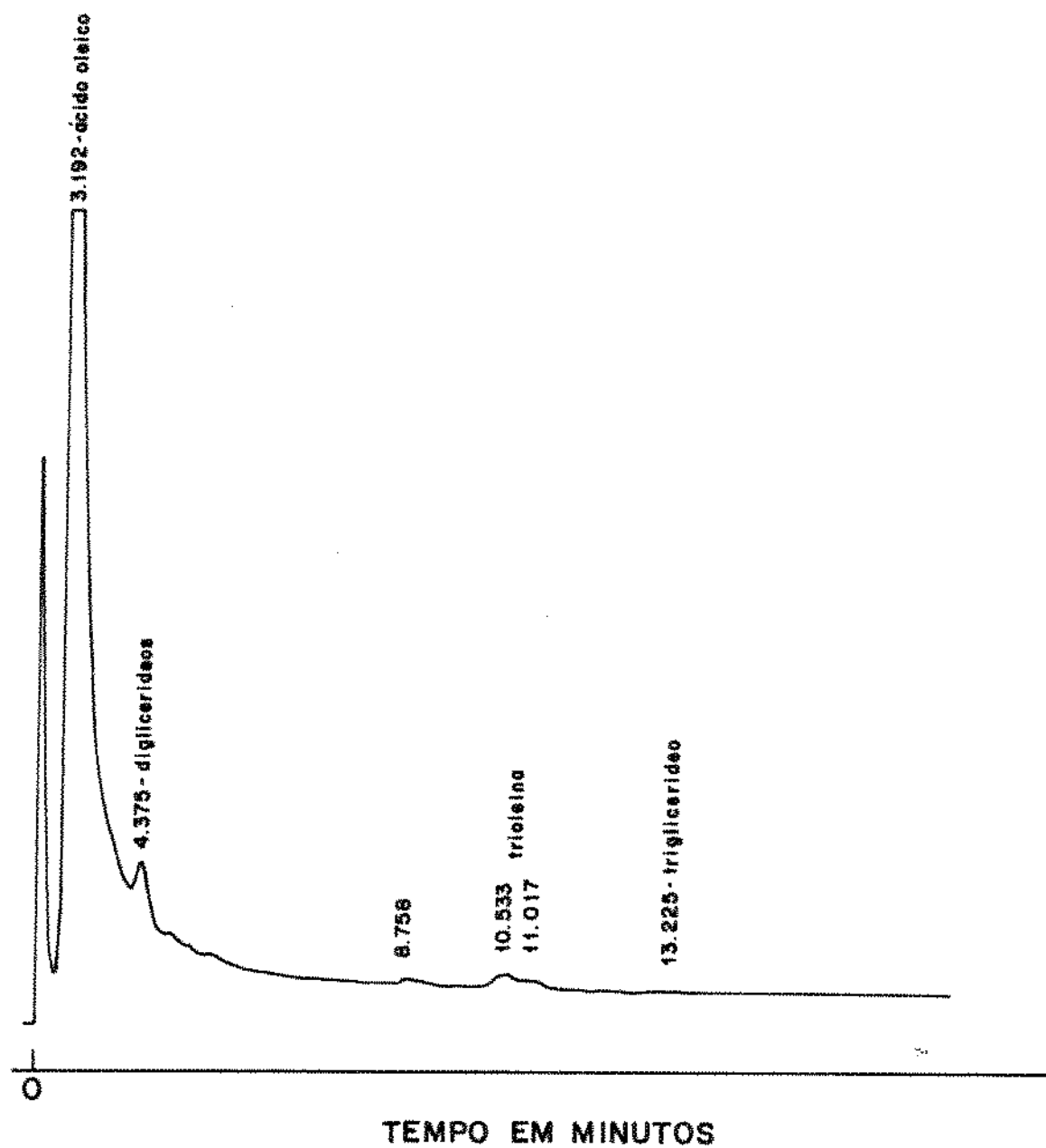


FIGURA 23 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Produtos de Hidrólise do óleo de Oliva por Sistema de Lipase Combinada $\text{Can}_{1,3} + \text{N}_{20}$, após 20 horas de Reação.



4.7. Estudo da Produção de Monoglicerídeo Através da Reação de Esterificação de Ácido Graxo e Glicerol por Lipase de *Penicillium* sp

O estudo da produção de monoglicerídeo através da esterificação de ácido graxo e glicerol foi realizado utilizando-se lipase de *Penicillium* sp (lipase G) de acordo com o método descrito no item 3.2.11.

A lipase de *Penicillium* sp foi selecionada para este estudo por apresentar maior porcentagem de esterificação em todos os tempos de reação testados. A Tabela 19 demonstra os resultados obtidos.

4.7.1. Efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática

O estudo do efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.2. A Figura 24 demonstra os resultados obtidos. A Figura 25 A, B e C ilustra os resultados demonstrando os produtos de esterificação enzimática em cromatografia de camada delgada de glicerol e ácido oleico nas proporções 1:1, 1:2 e 1:3 respectivamente.

A proporção molar entre glicerol e ácido oleico que apresentou maior porcentagem de esterificação foi 1 M de ácido oleico para 1 M de glicerol. A composição dos glicerídeos formados durante a reação de esterificação estão demonstrados

Tabela 19 - Seleção de lipase comercial para esterificação de ácido graxo e glicerol

Fonte de Lipase	Tempo de incubação (Horas) (% Esterificação)				
	4	14	18	24	48
<u>Candida rugosa</u>	3,89	14,4	19,3	21,9	21,7
<u>Penicillium sp</u>	6,9	25,1	29,6	33,2	39,5
<u>Rhizopus niveus</u>	6,6	18,7	21,8	25,0	27,3

FIGURA 24 - Efeito da Proporção entre Glicerol e Ácido Oleico no Grau de Esterificação Enzimática.

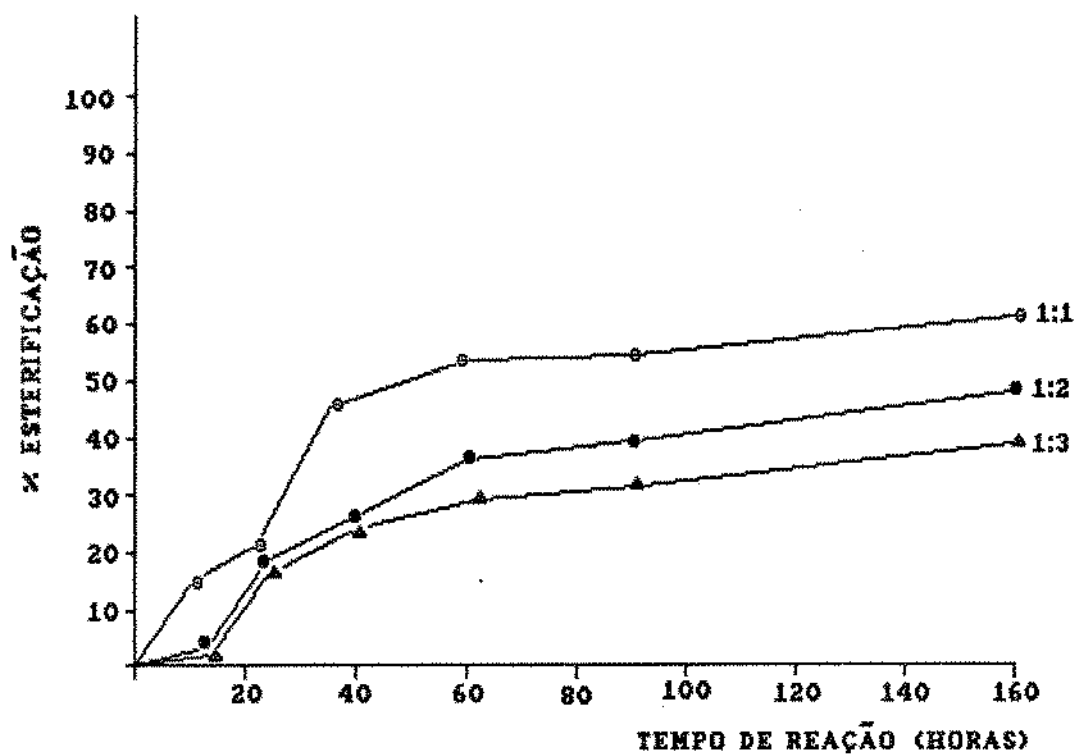


FIGURA 25A- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 1:1, por Lipase de Penicillium sp.

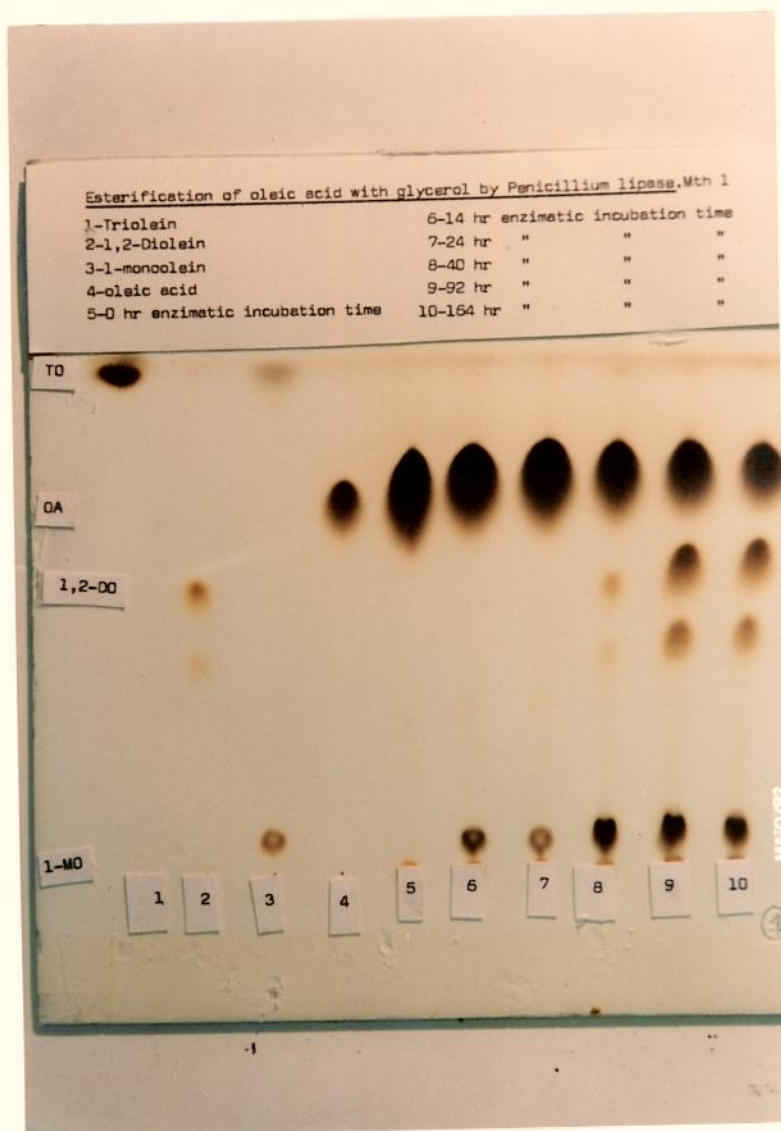


FIGURA 25B- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 2:1, por Lipase de Penicillium sp.

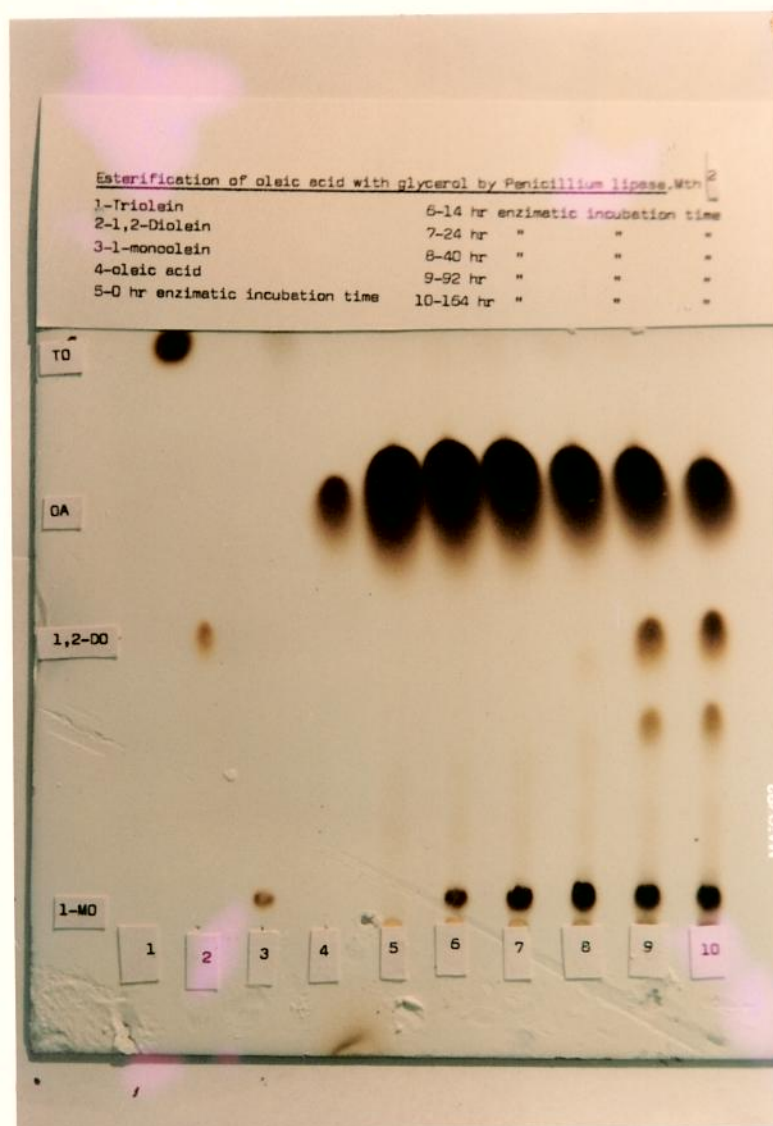
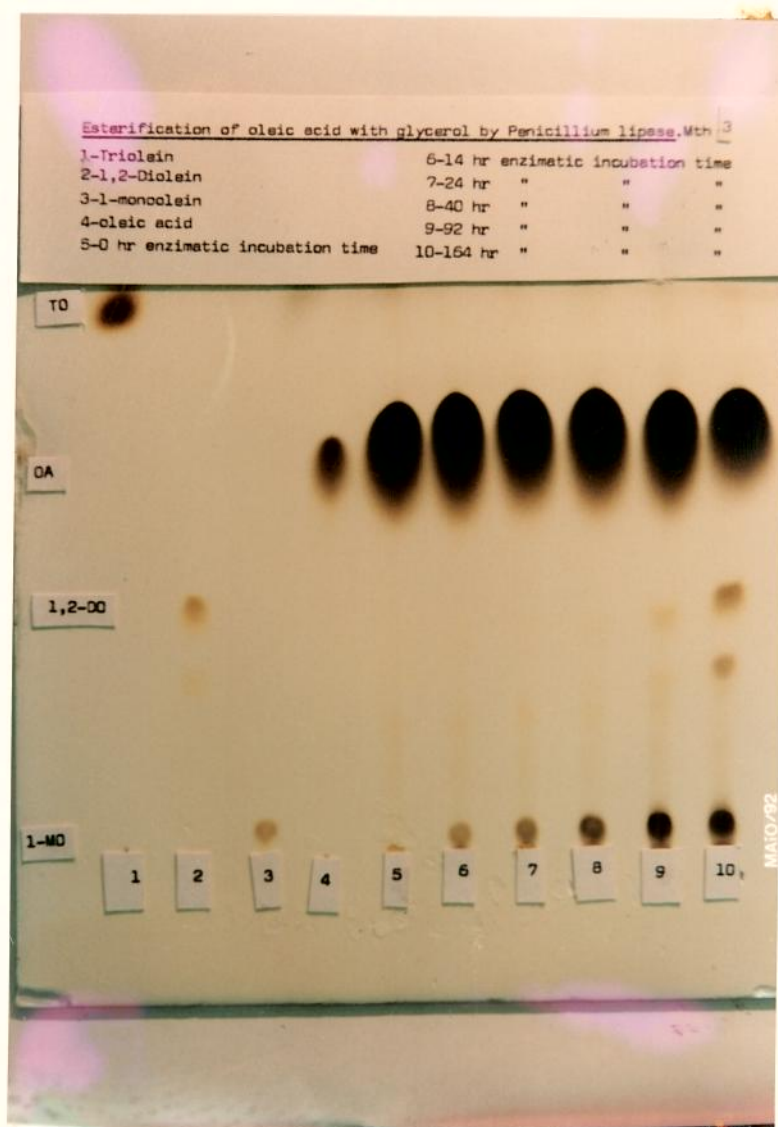


FIGURA 25C- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Esterificação de Ácido Oleico e Glicerol na Proporção 3:1, por Lipase de Penicillium sp.



na Tabela 20. Após 164 horas de incubação são formados 19,03% de monoleína e 31,81% de dioleína.

4.7.2. Efeito da concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol sobre o grau de esterificação enzimática

O estudo do efeito da concentração de ácido oleico em relação à concentração de glicerol sobre o grau de esterificação pela lipase de Penicillium sp foi realizado de acordo com o item 3.2.11.3.

A Tabela 21 ilustra a porcentagem de esterificação através do tempo de reação. Os dados indicam que quanto menor a concentração de ácido oleico em relação a concentração de glicerol maior será o grau de esterificação. Este chega a 71,9% com 64 horas de reação quando a proporção é de 3,8:0,26 para glicerol e ácido oleico respectivamente, e é praticamente o mesmo para a proporção 3,94:0,12 entre glicerol e ácido oleico respectivamente. A Figura 26 ilustra os resultados obtidos.

Dentre a formação de glicerídeos pela lipase de Penicillium sp, a Figura 27 A, B, C, D e E indica a produção de monoleína em relação as diversas variações na concentração molar de glicerol e ácido oleico.

Verifica-se que embora a porcentagem de esterificação seja semelhante entre as proporções 3,8:0,26 e 3,94: 0,12 de glicerol e ácido oleico os glicerídeos divergem na composição percentual. O monoglicerídeo 1-monoleína é obtido em maior

Tabela 20 - Composição dos glicerídeos formados na reação de esterificação entre glicerol e ácido oleico por lipase de Penicillium sp.

Composição do glicerídeo em %	Tempo de incubação			
	0	14	64	164
Ácido graxo	90,83	87,95	59,74	49,10
1(3)-Monoleína	-----	9,46	18,06	19,03
1,2(1,3)-Dioleína	-----	2,59	22,20	31,81
Trioleína				

Tabela 21 - Efeito da concentração de glicerol em relação a concentração de ácido oleico sobre o grau de esterificação enzimática.

Concentração Percentual de Glicerídeos	Tempo de Reação (Horas)														
	14					40					64				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Ácido oleico	52,2	76,6	84,1	87,3	86,0	---	37,6	62,2	71,3	69,4	---	25,9	42,3	53,0	55,4
1(3)-Monoleína	27,4	23,4	15,9	12,7	14,0	71,2	36,8	19,6	25,6	25,5	57,2	32,4	25,7	32,9	26,3
1,2(2,3)-Dioléína	20,41	---	---	---	---	28,8	25,6	18,2	3,11	5,1	42,8	41,7	32,0	14,0	18,3

Proporção entre glicerol e ácido oleico.

- 1- 3,94:0,12
- 2- 3,8 :0,26
- 3- 3,47:0,50
- 4- 3,06:1,0
- 5- 2,0 :2,0

FIGURA 26 - Efeito da Proporção entre Glicerol e Ácido Oleico sobre o Grau de Esterificação Enzimática após 64 horas de Reação.

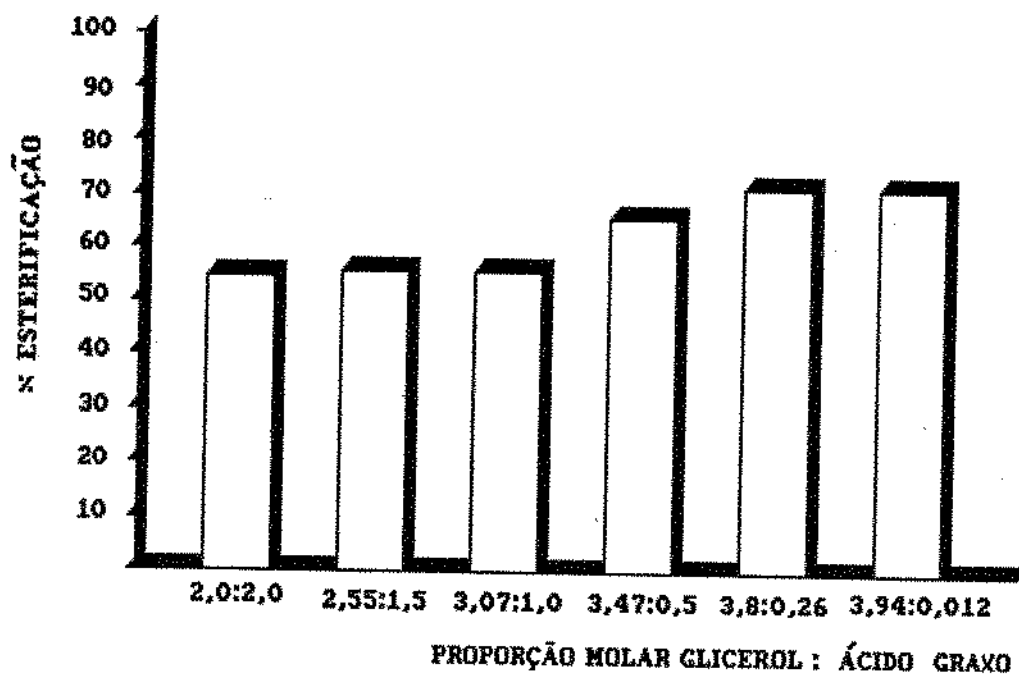


FIGURA 27A- Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação Enzimática, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,94:0,12

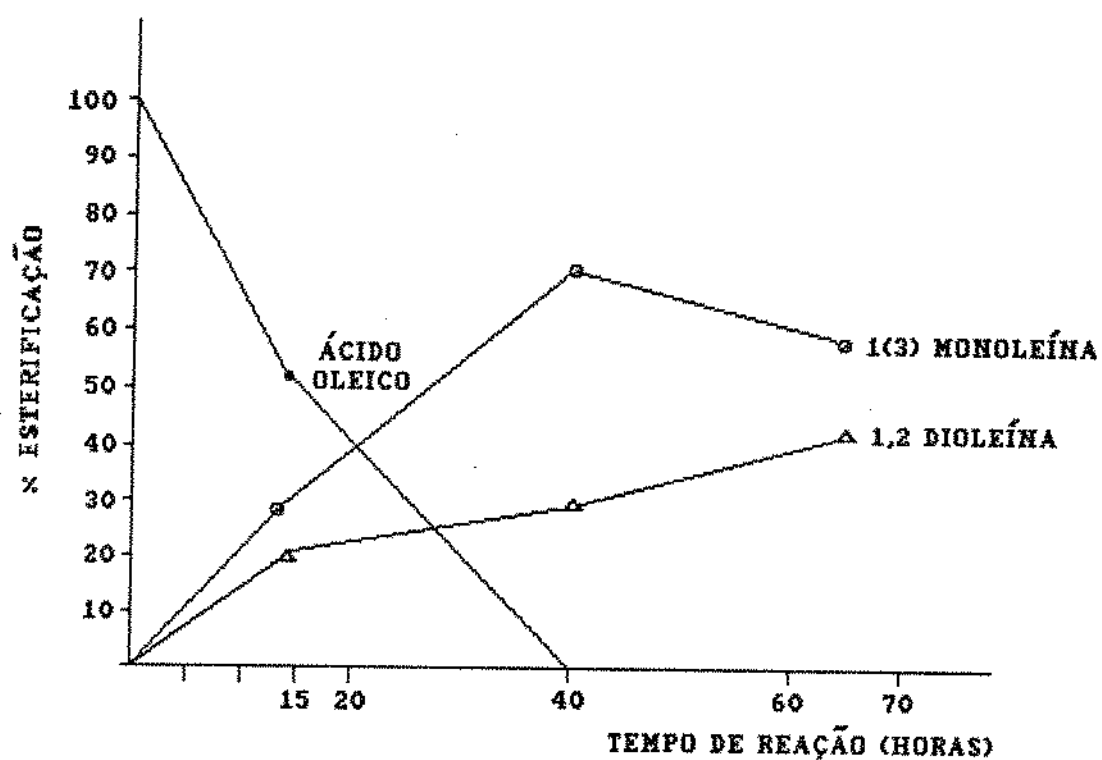


FIGURA 27B- Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação Enzimática, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,80:0,26.

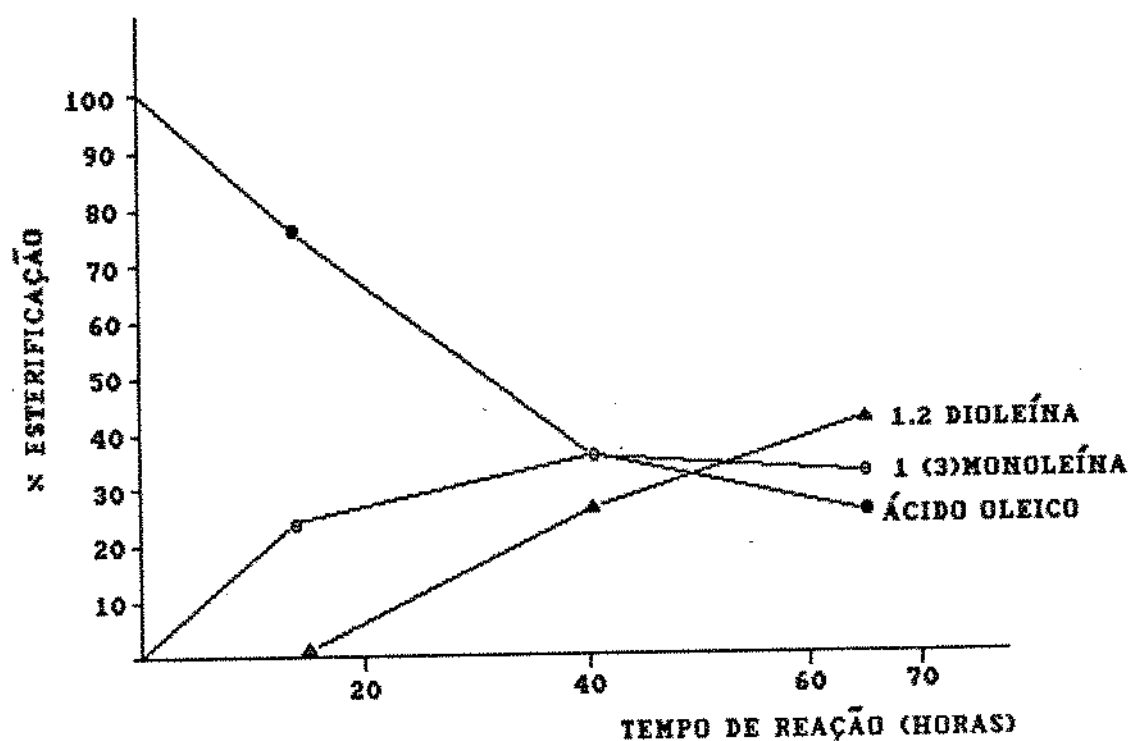


FIGURA 27C- Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação Enzimática, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,47:0,50.

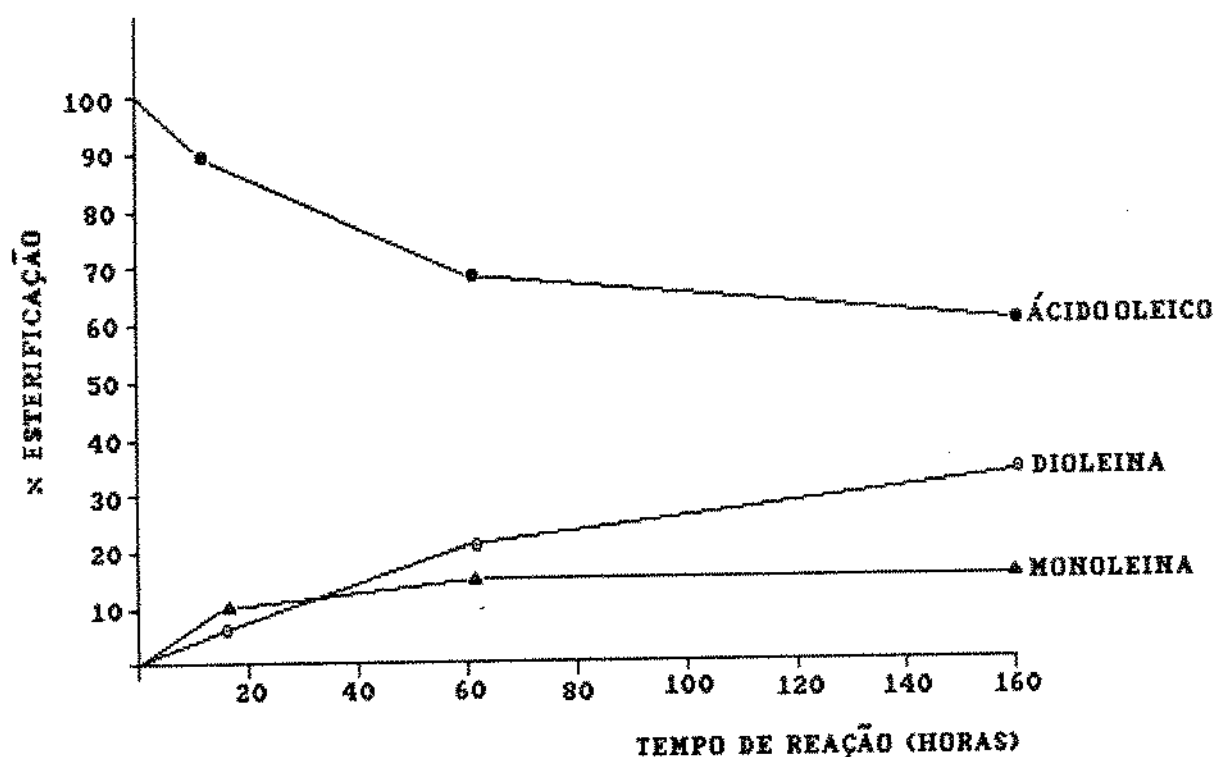


FIGURA 27D- Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação Enzimática, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 3,06:1,0.

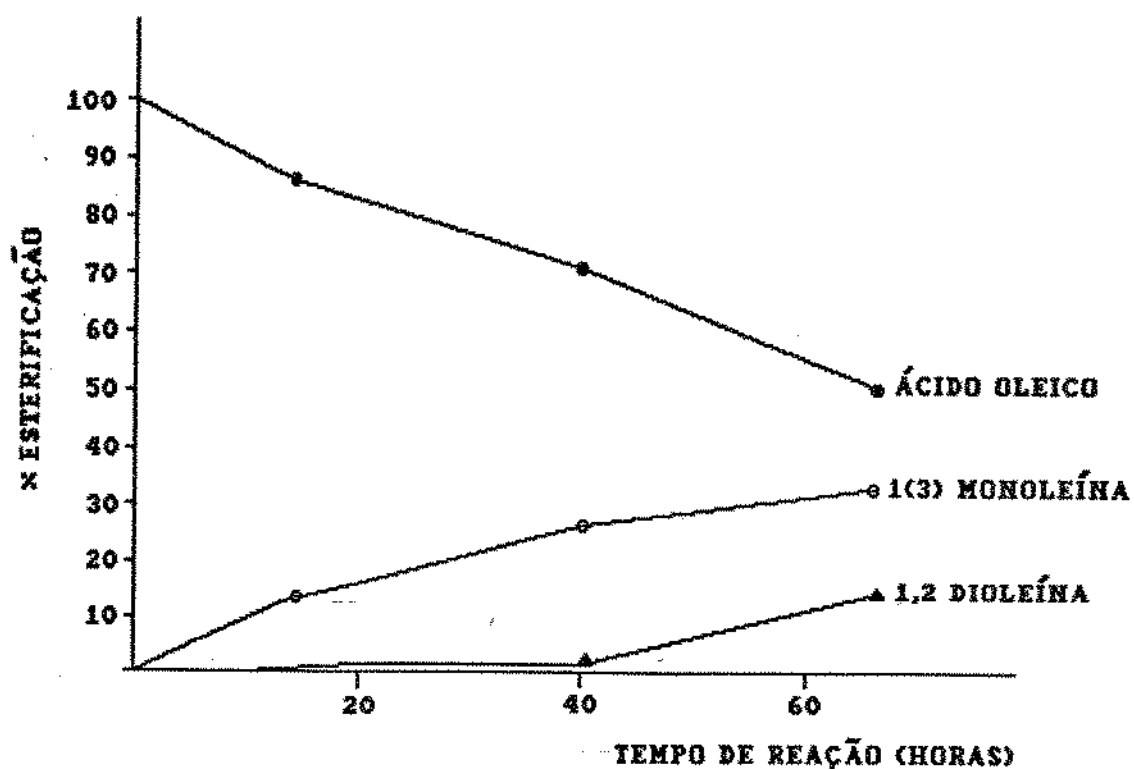
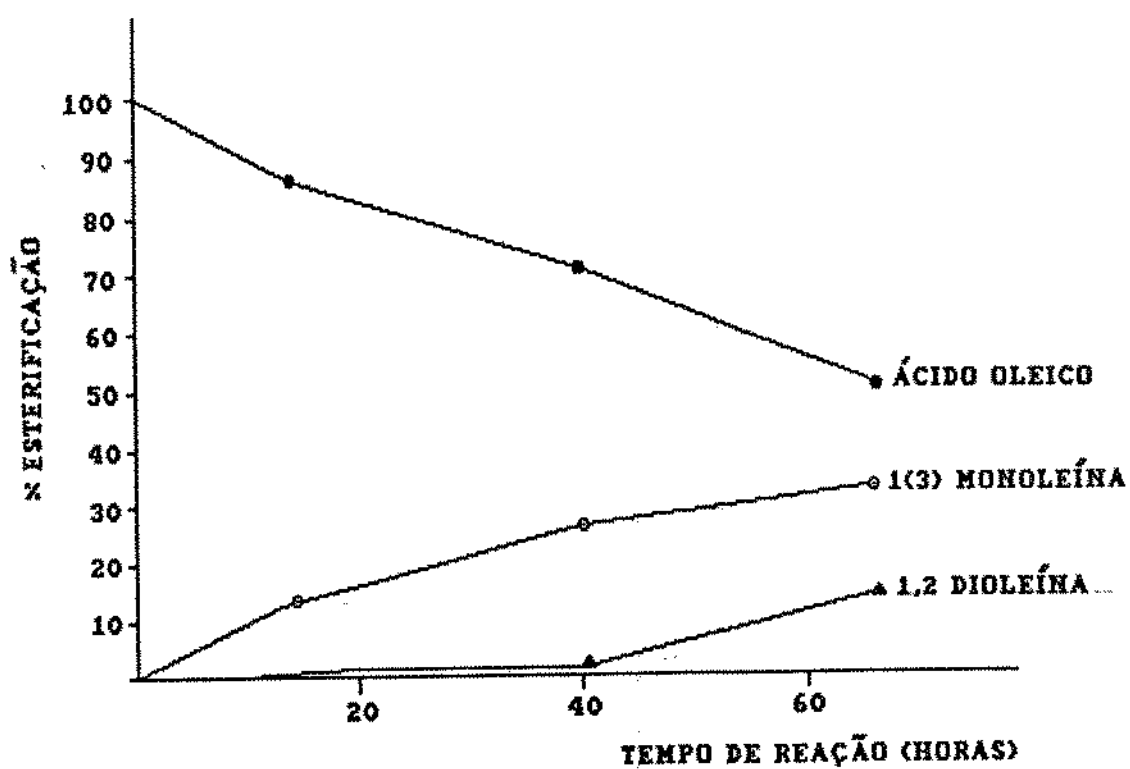


FIGURA 27E- Composição Percentual dos Glicerídeos Formados por Esterificação Enzimática, com Sistema de Reação Composto de Glicerol:Ácido Oleico na Proporção em moles 2,0:2,0.



porcentagem chegando a 78,2% quando a proporção em moles entre glicerol e ácido graxo é 3,94:0,12.

4.7.3. Efeito da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol no grau de esterificação enzimática

O estudo do efeito da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de glicerol foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.11.4. A Figura 28 ilustra os resultados obtidos.

Quando a concentração em moles de ácido oleico está na faixa de 0,50 a 1,0 moles em relação à concentração de 3,8 moles de glicerol, o grau de esterificação é praticamente similar entre 39 e 43% de esterificação.

A maior porcentagem de esterificação foi encontrada quando a concentração molar de ácido oleico foi de 0,06 moles, ou seja, a proporção de glicerol no sistema é de 63,3 vezes a concentração de ácido oleico, nas condições utilizadas para este ensaio. A Tabela 22 demonstra o grau de esterificação em porcentagem através do tempo de reação de 24, 40 e 64 horas.

As lipases de animais, vegetais e microrganismos catalizam a hidrólise parcial ou total de óleos e gorduras fornecendo ácidos graxos livres, glicerídeos e glicerol. É também conhecido, porém, que a reação é reversível e as lipases podem catalisar a formação de glicerídeos a partir de glicerol e ácidos graxos livres em condições onde o teor de água é restrito (OKUMURA et alii (173)).

FIGURA 28 - Efeito da Variação na Concentração Molar de Ácido Oleico no Sistema de Reação sobre o Grau de Esterificação Enzimática por Lipase de Penicillium sp.

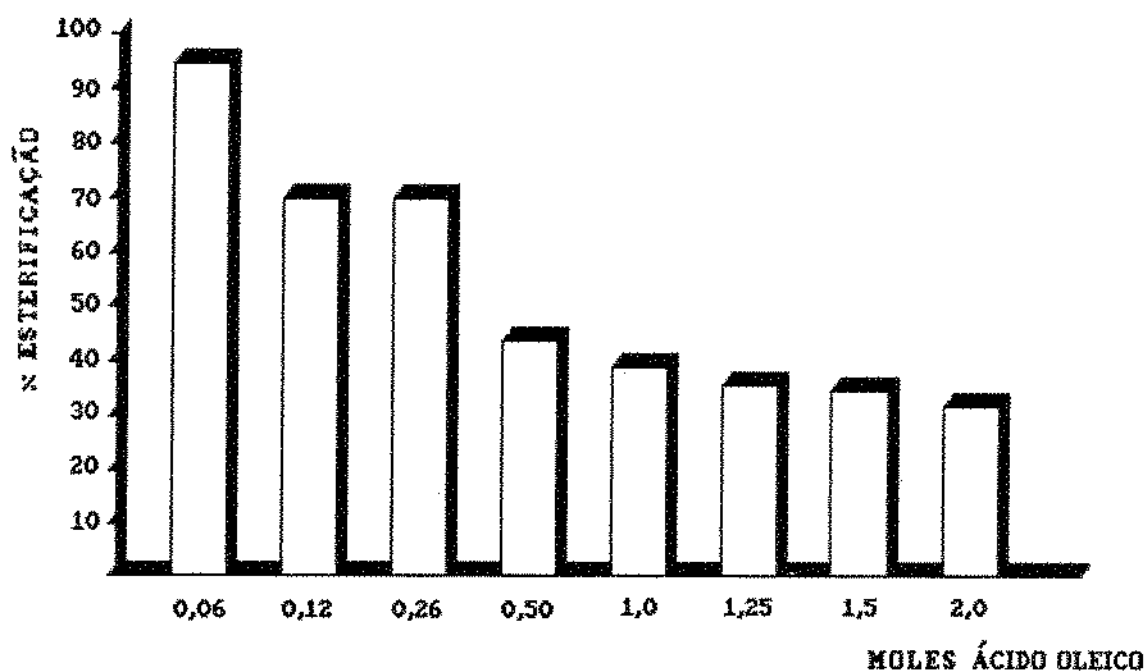


Tabela 22 - Efeito da concentração variável de ácido oleico em relação à concentração fixa de 3,8 moles de glicerol na esterificação enzimática (expresso em porcentagem de esterificação).

Concentração de Ácido Oleico (em moles)	Horas de Incubação % de Hidrólise		
	24	40	64
0,06	60,0	93,3	93,3
0,12	58,9	70,0	73,2
0,26	61,8	70,2	75,57
0,50	45,0	55,1	64,16
1,0	43,0	39,0	60,7
1,25	43,6	36,3	61,5
1,5	26,5	37,0	56,4
2,0	14,6	32,2	48,9

LINFIELD et alii (127) têm estudado a esterificação enzimática de ácido graxo e glicerol usando lipase de Aspergillus niger e Candida rugosa, verificando que a reação de esterificação era muito lenta e apenas após 6 semanas de reação 80% dos grupos hidroxilas foram esterificados.

A grande vantagem da esterificação enzimática é a possibilidade de dirigir a reação para formação dos glicerídeos desejados (monoglicerídeo, diglicerídeo e triglicerídeo) sem usar catalizadores químicos como haletos de acila, e temperaturas elevadas.

5- CONCLUSÕES

- 5.1. O microrganismo isolado e selecionado como maior produtor de lipase foi identificado como Trichoderma sp.
- 5.2. A enzima lipolítica produzida por Trichoderma sp N° 817 é uma lipase (glicerol-monoester hidrolase E.C. 3.1.1.23) que hidrolisa ligação éster de monoglicerídeos e paranitrofenyllaurato, liberando ácidos graxos.
- 5.3. A produção máxima de enzima extracelular de Trichoderma sp foi obtida entre 72 e 96 horas de fermentação a 30°C em meio de cultura constituído de farelo de arroz 5% e 3% de água de maceração de milho (corn steep liquor), 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ajustado para pH 6,0.
- 5.4. A lipase extracelular purificada através de fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia em coluna de DEAE-celulose e CM-celulose apresenta atividade ótima em tampão acetato pH 5,6 a 40-45°C. A enzima apresenta maior estabilidade na faixa de pH 5,0 a 7,0 em tampão acetato e fosfato respectivamente. A enzima é termossensível, o aquecimento da enzima purificada em tampão acetato 0,05 M pH 5,6 a 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60 e 65°C durante 1 hora na ausência do substrato resultou em 28, 35, 85 e 100% de inativação a 45, 50, 55 e 60°C respectivamente.

- 5.5. A atividade de lipase não é afetada significativamente por ZnSO_4 e AgNO_3 na concentração de 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade enzimática é fortemente inibida na presença de MgSO_4 , MnSO_4 e FeSO_4 na concentração de 1 mM de sal em relação ao volume final da reação. Os sais KCl , CaCl_2 e NiSO_4 inibiram moderadamente a atividade enzimática na concentração de 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação.
- 5.6. A presença dos ácidos graxos, ácido linoleico, ácido láurico, ácido oleico e ácido butírico na concentração de 10 mM em relação ao volume final no sistema de reação inibiu significativamente a atividade enzimática.
- 5.7. A atividade de lipase foi quase totalmente inibida pelo reagente cisteína na concentração de 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação parecendo indicar que a lipase de Trichoderma sp requer ponte dissulfeto (S-S) intacta para atividade.
- 5.8. Os valores de K_m e V_{max} da lipase foram respectivamente 0,185 mmoles e 0,42 μ moles ácido oleico/minuto/mg de proteína para o substrato 1(3)-monoleína e 0,25 mmoles e 0,71 μ moles ácido oleico/minuto/mg de proteína para o substrato 1,2(1,3)-dioleína. Para o substrato paranitro-

fenyllaurato os valores de K_m e U_{max} foram respectivamente: 0,78 mmoles e 3,85 μ moles paranitrofenol/minuto/mg proteína.

- 5.9. A lipase de Trichoderma sp hidrolisa cerca de 1,5 vezes mais 1(3)-monoleína do que 1,2(1,3)-dioleína e cerca de 10 vezes mais do que trioleína caracterizando ação de monoacilglicerol lipase, nas condições utilizadas no ensaio.
- 5.10. A utilização de lipases microbianas combinadas do tipo lipase de Candida rugosa (Can) e lipase de Penicillium sp (G) na concentração de 18 e 2 unidades de atividade respectivamente elevou a porcentagem de hidrólise enzimática de óleo de oliva para 95,9% após 20 horas de reação.
- 5.11. A produção de monoglicerídeos por esterificação enzimática é afetada pela proporção molar entre o glicerol e o ácido graxo do sistema de reação. A maior porcentagem para produção de monoleína utilizando-se lipase de Penicillium sp é encontrada quando a concentração de glicerol é 66,3 vezes a concentração de ácido oleico no sistema de reação, nas condições utilizadas no ensaio.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- ABRAMOWICZ, D.A.; KEESE, C.R. Enzymatic transesterification of carbonates in water restricted environments. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33: 149-156, 1989.
- 02- AKTHAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; CHUGTAI, M.I.D. Lipase induction in Mucor hiemalis. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 40(2): 257-263, 1980.
- 03- ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C. Journal of Food Science, 26: 512-523, 1961.
- 04- ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A. Production of lipase by Pseudomonas fragi in a synthetic medium. Journal of Bacteriology, vol. 86: 24-29, 1963.
- 05- ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A.; SUGGS, F.G. Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. Journal of Lipid Research, Vol 5: 390-394, 1964.
- 06- ANTONIAN, E. Recent advances in the purification characterization and structure determination of lipases. Lipids, Vol. 23(12): 1101-1105, 1988.

- 07- ARBIGE, M.V.; FREUND, P.R.; SILVER, S.C.; ZELKO, J.T. Novel lipase for "Cheddar" cheese flavor development. Food Technology, 4: 91-98, 1986.
- 08- ARIMA, K.; LIU, W-H.; BEPPU, T. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. Agricultural Biological Chemistry, Vol. 36, N° 11, p. 1913-1917, 1972.
- 09- BAILLARGEON, M.W. Purification and specificity of lipases from Geotrichum candidum. Lipids, Vol. 25(12): 841-848, 1990.
- 10- BAILLARGEON, M.W.; SONNET, P.E. Polyethylene glycol modification of Candida rugosa lipase. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(11): 1812-1815, 1988.
- 11- BALLS, B.A.K.; MATLACK, M.B. Mode of action of pancreatic lipase. Journal of Biological Chemistry, 123: 679-687, 1938.
- 12- BARKER, S.A. Modification of texture, colour and flavour by enzymes. International Industrial Biotechnology, Vol. 7(1): 222-224, 1987.
- 13- BATI, N.; HAMMOND, E.G.; GLATZ, B.A. Biomodification of fats and oils: Trials with Candida lipolytica. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(11): 1743-1746, 1984.

- 14- BAUMAN, H.E.; MacMILLAN, J.L.; STEIN, J.A. United States Patent Office. Food Technology, vol. 10(3), March 1956, 138-141.
- 15- BELL, G.; TODD, J. R. Hydrolysis of triglyceride by solid phase lipolytic enzymes of Rhizopus arrhizus in continuous reactor systems. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 23: 1703-1719, 1981.
- 16- BENZONANA, G. Some properties of an exocellular lipase from Rhizopus arrhizus. Lipids, Vol. 9(3): 166-173, 1974.
- 17- BERGLUND, L.; KHOO, J.C.; JENSEN, D.; STEINBERG, D. Resolution of hormone-sensitive triglyceride/diglyceride lipase from Monoglyceride lipase of chicken adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, 11: 5420-5425, 1980.
- 18- BERRY, J.A. Detection of microbial lipase by copper soap formation. Em: Laboratory Methods in Microbiology. Horrigan, W.F., McLance, M. Academic Press. London, 1966.
- 19- BEVINAKATTI, H.S.; BANERJI, A.A. Lipase catalysis: Factors governing transesterification. Biotechnology Letters, Vol. 10(6), 397-398, 1988.

- 20- BILYK, A.; BISTLINE, R.G.; HAAS, M.J.; FAIRHELLER, S.H. Lipase-catalyzed triglyceride hydrolysis in organic solvent. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(5): 320-323, 1991.
- 21- BISTLINE, R.G.; BILYK, A.; FAIRHELLER, S.H. Lipase-catalyzed formation of fatty amides. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(2): 95-98, 1991.
- 22- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Triglyceride interesterification by lipases. I. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(8): 519-524, 1990.
- 23- BOEL, E.; JENSEN, H.B.; CHRISTENSEN, M.; SHEM, L.; FILL, N.P. Rhizomucor miehei triglyceride lipase is synthesized as precursor. Lipids, Vol. 23, No 7: 701-712, 1988.
- 24- BRADY, C.; METCALFE, I.; SLABOSZEWSKI, D.; FRANK, D. Lipase immobilized on a hydrophobic, microporous support for the hydrolysis of fats. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 917-921, 1988.
- 25- BROCKMAN, H.L.; MONSEN, W.E.; TSUJITA, T. Lipid-lipid complexes: Properties and effects on lipase binding to surfaces. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 891-896, 1988.

- 26- BULDER, C.J.E.A. Some observations on the lipolytic activity of microorganisms and new method for its detection. Antoine van Leenwenhoek, 21: 432-443, 1955.
- 27- CHAU, L-Y.; TAI, H-H. Monoglyceride and diglyceride lipases from human platelet microsomes. Biochimica et Biophysica Acta, 963: 436-444, 1988.
- 28- DAHOD, S.K.; MANGANO, S.P. Carbon tetrachloride promoted stereo selective hydrolysis of methyl-2-chloropropionate by lipase. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 30: 995-999, 1987.
- 29- DAURANOV, K.D.; RAKHIMOV, A.K.H.; RAKHIMOV, M. Stabilization of lipase from fungus Rhizopus microsporus. Soviet Biotechnology, 3: 368-372, 1988.
- 30- DAURANOV, K.D.; TABAK, M.Y. Effect of carbon sources on lipase synthesis by the micromycete Oospora lactis. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, Vol. 26(3): 325-329, 1990.
- 31- DESHPANDE, V.M.; GADKARI, R.G.; MUKESH, D.; NARASIMHAN, C.S. Studies on kinetics of catalytic isomerization of methyl linoleate. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(4): , 1985.

- 32- DESNUELLE, P.; CONSTANTIN, M.J.; BALDY, J. Technique potentiométrique pour la mesure de l'activité de la lipase pancréatique. Bulletin Société Chimie Biologique, 37(2-3), 1955.
- 33- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, T. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350, 1956.
- 34- DZIEZAK, J.D. Enzyme modification of dairy products. Food Technology, 114-120, April 1986.
- 35- EITENMILLER, R.R.; VAKIE, J.R.; SWAHANI, K.M. Production and properties of Penicillium roqueforti lipase. Journal of Food Science, Vol. 35: 130-133, 1970.
- 36- EKIZ, H.I.; CAGLAR, M.A. Surface effects of solvents in hydrolysis of water-soluble lipids by Candida lipase. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33: 1213-1218, 1989.
- 37- ELLIOTT, J.M.; PARKING, K.L. Lipase-mediated acyl-exchanges reactions with butteroil in anhydrous media. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 18(11): 171-175, 1991.
- 38- ENTRESSANGLES, B.; PASERO, L.; SAVARY, P.; SARDO, C.; DESNUELLE, P. Influence de la nature des charnes sur la vitesse de leur hydrolyse par lipase pancréatique. Bulletin Société Chimie Biologique, 43: 581-591, 1961.

- 39- ERGAN, F.; TRANI, M.; ANDRE, G. Use of lipases in multiphasic systems solely composed of substrates. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(6): 412-417, 1991.
- 40- ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRER, A. Nutritional factors affecting lipase production by Rhizopus delemar CDBB-H313. Biotechnology Letters, vol. 12(3): 209-214, 1990.
- 41- FIELDING, C.J. Monoglyceride hydrolase activities of plasma and platelets. Journal of Biological Chemistry, Vol. 256(2): 876-881, 1981.
- 42- FIELDING, C.J.; FIELDING, P.E. Characteristics of triacylglycerol an partial acylglycerol hydrolysis by human plasma lipoprotein lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 620: 440-446, 1980.
- 43- FUJII, M.; HORIZOE, I.; FUKUNAGA, T.; KOGA, K.; AIZONO, Y. Appearance of triacylglycerol lipase in egg yolk sac of japanese quail during embryonic development, its partial purification and some properties. Agricultural Biological Chemistry, 50(2): 461-467, 1986.

- 44- FUJII, T.; TATARA, T.; MINAGAWA, M. Studies on applications of lipolytic enzyme in Detergency I. Effect of lipase from Candida cylindracea on removal of olive oil from cotton fabric. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 63(6): 796-799, 1986.
- 45- FUJIMOTO, Y.; NISHIOKA, K.; HASE, Y.; SADO, K.; FUJITA, T. Triacylglycerol lipase-mediated of arachidonic acid for renal medullary prostaglandin synthesis. Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 261, N° 2, p. 368-374, 1988.
- 46- GARCIA, H.S.; AMUNDSON, C.H.; HILL, C.G. Partial characterization of the action of an A. niger lipase on butteroil emulsions. Journal of Food Science, Vol. 56(5): 1233-1237, 1991.
- 47- GERVAIS, P.; MOLIN, P.; GRAJEK, W.; BENSOUSSAN, M. Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31: 457-463, 1988.
- 48- GOMI, K.; OTA, Y.; MINODA, Y. Isolation and identification of lipase activators from Saccharomycopsis lipolytica. Agricultural Biological Chemistry, 50(10): 2525-2530, 1986.

- 49- GOTZ, F.; POPP, F.; KORN, E.; SCHLEIFER, K.H. Complete nucleotide sequence of the lipase gene from Staphylococcus hyicus in Staphylococcus carnosus. Nucleic Acids Research, Vol. 13(16): 5895-5906, 1985.
- 50- GRAILLE, J.; MUDERHWA, J.J.; PINA, M. A method for determination of interesterification activity of biocatalysts. Fat Science Technology, 89(6): 224-226, 1987.
- 51- HARPER, W.J.; GOULD, I.A. Lipase systems used in the manufacture of italian cheese. I. General characteristics. Journal of Dairy Science, Vol. 38(1): 1955.
- 52- HARPER, W.J. Lipase systems used in the manufacture of italian cheese. II. Selective hydrolysis. Journal of Dairy Science, Vol. 40(5): 556-563, 1957.
- 53- HARPER, W.J.; LONG, J.E. Italian cheese ripening. IV. Various free amino and fatty acids in commercial provolone cheese. Journal of Dairy Science, Vol. 39(2): 129-137, 1956.
- 54- HARRINGTON, K.J.; EVANS, C.D. A comparison of conventional and in situ methods of transesterification of seed oil from a series of sunflower cultivars. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(6), 1985.

- 55- HEDEDUS, D.D.; KHACHATOURIANS, G.G. Production of and extracellular lipase by Beauveria bassiana. Biotechnology Letters, Vol. 10(9): 637-642, 1988.
- 56- HILL, S.M.J.; KIEWITT, I.; MUKHERFEE, K.D. Enzymatic fractionation of fatty acids: Enrichment of α -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(9): 561-564, 1990.
- 57- HIRATA, H.; HIGUCHI, K.; YAMASHINA, T. Lipase-catalyzed tranesterification in organic solvent: Effects of water and solvent, thermal stability and some applications. Journal of Biotechnology, Vol. 14: 157-167, 1990.
- 58- HOFELMANN, M.; HARTMANN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Isolation, purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical Aspergillus niger enzyme. Journal of Food Science, Vol. 50: 1721-1725, 1985.
- 59- HOLMBERG, K.; OSTERBERG, E. Enzymatic preparation of monoglycerides in microemulsion. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(9): 1544-1548, 1988.
- 60- HOQ, M.M.; TAGAMI, H.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Some characteristics of continuous glyceride synthesis by lipase in a microporous hydrophobic membrane bioreactor. Agricultural Biological Chemistry, 49(2): 335-342, 1985.

- 61- HQQ, M.M.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Continuous synthesis of glycerides by lipase in a microporous membrane Bioreactor. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(4): 776-781, 1984.
- 62- HQQ, M.M.; YAMANE, T. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(6): 1016-1021, 1985.
- 63- HUANG, A.H.C.; LIN, Y.H.; WANG, S. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 897-899, 1988.
- 64- HUANG, H.T.; DOOLEY, J.G. Enhancement of cheese flavors with microbial esterase. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 18: 909-919, 1976.
- 65- HUTTUNEN, J.K.; STEINBERG, D. Activation and phosphorylation of purified adipose tissue hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. Biochimica et Biophysica Acta, 239: 411-427, 1971.
- 66- ISHIHARA, H.; OKUYAMA, H.; IKEZAWA, H.; TEJIMA, S. Studies on lipase from Mucor javanicus. I. Purification and properties. Biochimica et Biophysica Acta, 388: 413-422, 1975.

67- ISDBE, K.; AKIBA, T.; YAMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from Penicillium cyclopium. Agricultural Biological Chemistry, 52(1): 41-47, 1988.

68- ISDN, A.P.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. Effect of solvent concentration on enzyme catalysed interesterification of fats. Enzyme Microbiology Technology, Vol. 10: 47-51, 1988.

69- ITOH, T.; TANAKA, M.; KANEKO, H. Application of silica gel sintered plate to thin layer lipid chromatographic analysis. Lipids, Vol. 8(5): 259-262, 1973.

70- IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. The comparison of the properties of two lipases from Penicillium cyclopium Westring. Agricultural Biological Chemistry, 39(5): 1063-1070, 1975.

71- IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The purification and the properties of three kinds of lipases from Rhizopus delemar. Agricultural Biological Chemistry, 38(6): 1241-1245, 1974.

72- IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Interconversion of two lipase from Rhizopus delemar. Agricultural Biological Chemistry, 38(6): 1249-1254, 1974.

- 73- JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMAN, K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from Geotrichum candidum. Enzyme Microbiology Technology, Vol. 11(2): 90-95, 1989.
- 74- JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMAN, K. Substrate specificity of Geotrichum candidum lipase preparations. Biotechnology Letters, Vol. 12(2): 121-126, 1990.
- 75- JAMES, A.T. The Biotechnology of oilseed crops. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(2): 204-206, 1985.
- 76- JANSSEN, A.E.M.; LEFFERTS, A.G.; van'TRIET, K. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters in aqueous media. Biotechnology Letters, Vol. 12(10): 711-716, 1990.
- 77- JENSEN, H.B.; GALLUZZO, D.R.; JENSEN, R.G. Partial purification and characterization of free and immobilized lipases from Mucor miehei. Lipids, Vol. 22(8): 559-565, 1987.
- 78- JENSEN, H.B.; GALLUZZO, D.R.; JENSEN, R.G. Studies on free and immobilized lipases from Mucor miehei. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 905-910, 1988.
- 79- JENSEN, R.G. Symposium: Microbial lipolytic enzymes. Lipids, Vol. 9(3): 149-157, 1974.

- 80- JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase (Acylglycerol Hydrolase) activity from various sources. Lipids, Vol. 18(9): 650-657, 1983.
- 81- JENSEN, R.G.; DEJONG, F.A.; CLARK, R.M. Determination of lipase specificity. Lipids, Vol. 18(3): 239-252, 1983.
- 82- JENSEN, R.G.; DUTHIE, A.H.; GANDER, G.W.; MORGAN, M.E. Some evidence supporting the specificity of milk lipases for the primary hydroxyl positions of milk glycerides. Journal of Dairy Science, 43(1): 96-99, 1960.
- 83- JENSEN, R.G.; FERRAINA, R.A. Separation of tri, 1,3 di- and 1-mono-oleoylglycerols and oleic acid by flash chromatographic. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 66(1): 135-136, 1989.
- 84- JENSEN, R.G.; GORDON, D.T.; SCHOLFIELD, C.R. Hydrolysis of linoleate geometric isomers by Geotrichum candidum lipase. Lipids, Vol. 8(5): 323-325, 1973.
- 85- JENSEN, R.G.; MARKS, T.A.; SAMPUGNA, J.; QUINN, J.G.; CARPENTER, D.L. Purification of triglycerides with an alumina column. Lipids, Vol. 1(6): 451-452, 1966.

- 86- JENSEN, R.G.; SAMPUGNA, J.; QUINN, J.G.; CARPENTER, D.L.; MARKS, T.A. Specificity of a lipase from Geotrichum candidum for cis-octadenoic acid. Journal of American Oil Chemist's Society, vol. 42: 1029-1032, 1965.
- 87- KAIMAL, T.N.B.; SAROJA, M. Selective removal of linoleic acid from soybean oil by lipase-catalyzed interesterification at low temperature. Biotechnology Letters, Vol. 10(5): 337-340, 1988.
- 88- KAIMAL, T.N.B.; SAROJA, M. Enhancement of catalytic activity of porcine pancreatic lipase by reducing alkylation. Biotechnology Letters, Vol. 11(1): 31-36, 1989.
- 89- KANG, S.T.; RHEE, J.S. Effect of water on hydrolysis of olive oil by immobilized lipase in reverse phase system. Biotechnology Letters, Vol. 10(5): 341-346, 1988.
- 90- KANG, S.T.; RHEE, J.S. Characteristics of immobilized lipase catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33: 1469-1476, 1989.
- 91- KAHN, I.M.; DILL, C.W.; CHANDAN, R.C.; SHAHANI, K.M. Production and properties of the extracellular lipase of Achromobacter lipolyticum. Biochimica et Biophysica Acta, 132: 68-77, 1967.

- 92- KERMASHA, S.; van de VOORT, F.R. Lipase activity and fatty acid composition in stored full-fat french bean flour. Canadian Institute of Food Science Technology Journal, Vol. 19, N° 3, 92-94, 1986.
- 93- KERMASHA, S.; van de VOORT, F.R. Characterization of french bean (Phaseolus vulgaris) seed lipase. Canadian Institute of Food Science Technology Journal, Vol. 19, N° 1, 23-27, 1986.
- 94- KHOO, J.C.; AQUINO, A.A.; STEINBERG, D. The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. Journal of Clinical Investigation, vol. 53: 1124-1131, 1974.
- 95- KHOO, J.C.; STEINBERG, D. Reversible protein kinase activation of hormone-sensitive lipase from chicken adipose tissue. Journal of Lipid Research, Vol. 15: 602-610, 1974.
- 96- KHOO, J.C.; SPERRY, P.J.; GILL, G.N.; STEINBERG, D. Activation of hormone-sensitive lipase and phosphorylase kinase by purified cyclic GMP-dependent protein kinase. Proceedings National Academic Science USA, Vol. 74, N° 11, 4843-4847, 1977.
- 97- KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalyzed hydrolysis of Palm oil. Journal of American Oil Chemists' Society, Vol. 63(4): 538-540, 1986.

- 98- KILARA, A. Enzyme-modified lipid food ingredients. Process Biochemistry, 4: 35-45, 1985.
- 99- KILARA, A.; SHAHANI, K.M. The kinetic properties of lactase, papain and lipase immobilized on a single Support. Journal of Food Biochemistry, 1: 261-273, 1977.
- 100- KIM, K.H.; KWON, D.Y.; RHEE, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. Lipids, Vol. 19(12): 975-977, 1984.
- 101- KIM, S.M.; RHEE, J.S. Production of medium-chain glycerides by immobilized lipase in a solvent-free system. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(7): 499-503, 1991.
- 102- KINSELLA, J.E.; HWANG, D. Biosynthesis of flavors by Penicillium roqueforti. Biotechnology and Bioengineering, vol. 18: 927-938, 1976.
- 103- KLIBANOV, A.M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. Trends in Biological Science, Vol. 14: 141-144, 1989.
- 104- KODERA, Y.; TAKAHASHI, K.; NISHIMURA, H.; MATSUSHIMA, S.; SAITO, Y.; INADA, Y. Ester synthesis from α -substituted carboxylic acid catalyzed by polyethylene glycol-modified lipase from Candida cylindracea in benzene. Biotechnology Letters, Vol. 8(12): 881-884, 1986.

105- KOKUSHO, Y.; MACHIDA, H.; IWASAKI, S. Studies on alkaline lipase: Isolation and identification of lipase producing microorganisms. Agricultural Biological Chemistry, 46(5): 1159-1164, 1982.

106- KORITALA, S.; HESSELTINE, C.W; PRYDE, E.H.; MOUNTS, T.L. Biochemical modification of fats by microorganisms: A preliminary survey. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 64(4): 509-513, 1987.

107- KORITALA, S. Esterification of fatty acids by Aspergillus flavus. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(7): 1188-1189, 1988.

108- KOSUGI, Y.; KAMIBAYASHI, A. Thermostable lipase from Pseudomonas sp. cultural conditions and properties of the crude enzyme. Journal Fermentation Technology, Vol. 49(12): 968-980, 1971.

109- KOSUGI, Y.; SUZUKI, H. Fixation of cell-bound lipase and properties of the fixed lipase as an immobilized enzyme. Journal Fermentation Technology, Vol. 51(12): 895-903, 1973.

110- KOSUGI, Y.; SUZUKI, H. Affinity chromatographic studies on the adsorption of lipase on aliphaticamine-Sepharose 4B. Journal Fermentation Technology, Vol. 52(8): 577-582, 1974.

- 111- KOSUGI, Y.; SUZUKI, H. Hydrolysis of beef tallow by lipase from Pseudomonas sp. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31: 349-356, 1988.
- 112- KOSUGI, Y.; TANAKA, H.; TOMIZUKA, N. Continuous hydrolysis of oil by immobilized lipase in a countercurrent reactor. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 36: 617-622, 1990.
- 113- KOUKLER, G.; JAEGER, . Specific and Sensitive plate assay for bacterial lipases. Applied and Environmental Microbiology, p. 211-213, Jan. 1987.
- 114- KUTSUKI, H.; SAWA, I. HASEGAWA, J. Asymmetric hydrolysis of (dl)-1-acyloxy-2-halo-1-phenylethanes with lipases. Agricultural Biological Chemistry, 50(9): 2369-2373, 1986.
- 115- KWON, D.Y.; RHEE, J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipases assay. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 63(1): 89-92 1986.
- 116- LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATI, J. Short-chain flavour esters synthesis by microbial lipases. Biotechnology Letters, Vol. 12(8): 581-586, 1990.
- 117- LANING, S.J. Chemical interesterification of palm, palm kernel and coconut oils. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(2): 400-407, 1985.

- 118- LAVAYRE, J.; BARATTI, J. Preparation and properties of immobilized lipases. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 24: 1007-1013, 1982.
- 119- LAWRENCE, R.C. Microbial lipases and related esterases. Part I. Detection, distribution and production of microbial lipases. Dairy Science Abstracts, 29(1): 1-8, 1967.
- 120- LAWRENCE, R.C. Microbial lipases and related esterases. Part II. Estimation of lipase activity, characterization of lipases. Recent work concerning their effect on dairy products. Dairy Science Abstracts, 29(2): 59-70, 1967.
- 121- LAWRENCE, R.C.; FRYER, T.F.; REITER, B. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipases. Nature, 1264-1265, 1967.
- 122- LECHNER, M.; MARKL, H.; GOTZ, F. Lipase production of Staphylococcus carnosus in a dialysis fermentor. Applied Microbiology and Biotechnology, 28: 345-349, 1988.
- 123- LEE, I.; HAMMOND, E.G. Oat (Avena sativa) cariopses as a natural lipase bioreactor. Journal of American Oil Chemists Society, Vol. 67(11): 761-765, 1990.

- 124- LEITGEB, M.; KNEZ, Z. The influence of water on the syntheses of n-butyl oleate by immobilized Mucor miehei lipase. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(11): 775-778, 1990.
- 125- LIEBERMAN, R.B.; OLLIS, D.F. Hydrolysis of particulate tributyrin in a fluidized lipase reactor. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 17: 1401-1419, 1975.
- 126- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. Journal of American Chemistry, 56: 658-666, 1934.
- 127- LINFIELD, W.M.; BARAUSKAS, R.A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(2): 191-195, 1984.
- 128- LINFIELD, W.M.; O'BRIEN, D.J.; SEROTA, S.; BARAUSKAS, R.A. Lipid-lipase interactions. I. Fat splitting with lipase from Candida rugosa. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(6): 1067-1071, 1984.
- 129- LINFIELD, W.M.; SEROTA, S.; SIVIERI, L. Lipid-lipase interactions. II. A new method for the assay of lipase activity. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(7): 1152-1154, 1985.

- 130- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F.; RANDALL, R.F. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275, 1951.
- 131- LU, J.Y.; LISKA, B.J. Lipase from Pseudomonas fragi. I. Purification of the enzyme. Applied Microbiology, Vol. 18(1): 104-107, 1969.
- 132- LU, J.Y.; LISKA, B.J. Lipase from Pseudomonas fragi. II. Properties of the enzyme. Applied Microbiology, Vol. 18(1): 108-113, 1969.
- 133- LUDDY, F.E.; BARFORD, R.A.; HERB, S.F.; MAGIDMAN, P.; RIEMENSCHNEIDER, R.W. Pancreatic lipase hydrolysis of triglycerides by a semimicro technique. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 41(10): 693-696, 1964.
- 134- LUDDY, F.E.; HAMPSON, J.W.; HERB, S.F.; ROTHBART, H.L. Development of edible tallow fractions for specialty fat uses. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 50, 1973.
- 135- MACRAE, A.R. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 60(2): 291-294, 1983.

- 136- MALCATA, F.X.; DEYES, H.R.; GARCIA, H.S.; HILL, C.G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils. A Review. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(12): 890-910, 1990.
- 137- MANJON, A.; IBARRA, J.L.; AROCAS, A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. Biotechnology Letters, Vol. 13(5): 339-344, 1991.
- 138- MARKS, T.A.; QUINN, J.G.; SAMPUGNA, J.; JENSEN, R.G. Studies on the specificity of a lipase system from Geotrichum candidum. Lipids, Vol. 3(2): 143-146, 1968.
- 139- MARTY, A.; CHULALAKSANANUKUL, J.S.; CONDOPET, J.S.; WILLEMOT, R.M.; DURAND, G. Comparison of lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide and in n-hexane. Biotechnology Letters, Vol. 12(1): 11-16, 1990.
- 140- MATHIS, R.; MOUREY, A.; HUBERT, P. One-step purification of a lipolytic enzyme from Bacillus pumilus by mild hydrophobic interaction chromatography on polyoxyalkylene glycol-bound sepharose 6B. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No 5, 1307-1308, 1988.
- 141- MATTSON, F.H.; BECK, L.W. The digestion in vitro of triglycerides by pancreatic lipase. Journal of Biological Chemistry, 214: 115-125, 1955.

142- MATTSON, F.H.; VOLPENHEIN, R.A. Enzymatic hydrolysis at an oil/water interface. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 43: 286-289, 1966.

143- McKELLAR, R.C. A rapid colorimetric assay for the extracellular lipase of Pseudomonas fluorescens B52 using -naphthyl caprylate. Journal of Dairy Research, 53: 117-127, 1986.

144- McKELLAR, R.C.; CHOLETTE, H. Determination of the extracellular lipases of Pseudomonas fluorescens sp in skim milk with the -naphthyl caprylate assay. Journal of Dairy Research, 53: 301-312, 1986.

145- McMAHON, K.E.; PITAS, R.E.; JENSEN, R.G. Glycerol ester hydrolase activity in the pulp of unerupted calves teeth. Lipids, Vol. 2(2): 238-239, 1977.

146- McNEILL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(11): 779-783, 1990.

147- McNEILL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. High-yield enzymatic glycerolysis of fats and oil. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(1): 1-5, 1991.

148- McNEILL, G.P.; YAMANE, T. Further improvements in the yield of monoglycerides during enzymatic glycerolysis of fats and oils. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(1): 6-10, 1991.

149- MEFFERT, A. Technical uses of fatty acid esters. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(2): 255-258, 1984.

150- MILLER, C.; AUSTIN, H.; POSORSKE, L.; GONZALEZ, J. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6) 927-931, 1988.

151- MOREAU, H.; GARGOURI, Y.; LECAT, D.; JUNIEN, J-L.; VERGER, R. Purification, characterization and kinetic properties of the rabbit gastric lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 960: 286-293, 1988.

152- MORRIS, H.A.; JEZESKY, J.J.. The action of microorganisms on fats. II. Some characteristics of the lipase system of Penicillium roqueforti. Journal of Dairy Science, Vol. 36: 1285-1297, 1953.

153- MOSKOWITZ, G.J.; CASSAIGNE, R.; WEST, I.R.; SHEN, T.; FELDMAN, L.I. Hydrolysis of animal fat and vegetable oil with Mucor miehei esterase properties of the enzyme. Journal Agricultural Food Chemistry, Vol. 5: 1146-1150, 1977.

154- MUDERHWA, J.M.; RATOMAHENINA, R. Purification and properties of the lipase from Candida deformans (Zach) Langeron and Guerra. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62(6): 1031-1036, 1985.

155- MUDERHWA, J.M.; RATOMAHENINA, R.; PINA, M.; GRAILLE, J.; GALZY, P. Purification and properties of the lipases from Rhodotorula pilimanae Hedrick and Burke. Applied Microbiology and Biotechnology, 23: 348-354, 1986.

156- MUKATAKA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, J. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. Journal Fermentation Technology, Vol. 63(5): 461-466, 1985.

157- NAGAO, A.; KITO, M. Synthesis of O-acyl-homoserine by lipase. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 66(5): 710-713, 1989.

158- NAGAOKA, K.; YAMADA, Y.; KOAZE, Y. Studies on Mucor lipase. Part I. Production of lipases with a newly isolated Mucor sp. Agricultural Biological Chemistry, 33(3): 299-305, 1969.

159- NAGAOKA, K.; YAMADA, Y. Purification of Mucor lipases and their properties. Agricultural Biological Chemistry, 37(12), 2791-2796, 1973.

160- NAHAS, E. Control of lipase production by Rhizopus oligosporus under various growth conditions. Journal of General Microbiology, 134: 227-233, 1988.

161- NAIR, C.S.; BONE, D.H. Production of lipase of Aspergillus foetidus in a batch stirred reactor. Biotechnology Letters, Vol. 9(8): 601-604, 1987.

162- NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; KYOTANI, S.; MORIKAWA, H. Culture conditions for extracellular lipase production by Rhizopus chinensis and its immobilization within Biomass support. Journal Fermentation Technology, Vol. 66(4): 441-448, 1988.

163- NAKASHIMA, T.; FUKUDA, H.; NOJIMA, Y.; NAGAI, S. Intracellular lipase production by Rhizopus chinensis using biomass support particles in a circulating bed fermentor. Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 68(1): 19-24, 1989.

164- NEGISHI, S.; SATO, S.; MUKATAKA, S.; TAKAHASHI, J. Utilization of powdered pig bone as a support for immobilization of lipase. Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 67(5): 350-355, 1989.

165- NEIDLEMAN, S.L.; GEIGERT, J. Biotechnology and oleochemicals: Changing Patterns. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(2): 290-296, 1984.

166- NISHIO, T.; CHIKANO, T.; KAMIMURA, M. Purification and some properties of lipase produced by Pseudomonas fragi 22.39B. Agricultural Biological Chemistry, 51(1): 181-186, 1987.

167- NISHIO, T.; CHIKANO, T.; KAMIMURA, M. Substrate specificity and mode of action of lipase produced by Pseudomonas fragi 22.39B. Agricultural Biological Chemistry, 59(9): 2525-2529, 1987.

168- NISHIO, T.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, T.; YOSHIMOTO, T.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; SAITO, Y.; INADA, Y. Ester synthesis in benzene by polyethylene glycol modified lipase from Pseudomonas fragi 22.39B. Journal of Biotechnology, 8: 39-44, 1988.

169- NORIN, M.; BOUTELJE, J.; HOLMBERG, E.; HULT, K. Lipase immobilized by adsorption. Applied Microbiology Biotechnology, 28: 527-530, 1988.

170- ODERA, M.; TAKEUCHI, K.; TOH-E, A. Molecular cloning of lipase genes from Alcaligenes denitrificans and their expression in Escherichia coli. Journal Fermentation Technology, Vol. 64(5): 363-371, 1986.

171- OKEKE, C.N.; OKOLO, B.N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by Acremonium strictum. Biotechnology Letters, Vol. 12(10): 747-750, 1990.

172- OKUMURA, J.; KINSELLA, J.E. Methyl ketone formation by Penicillium camemberti in model systems. Journal of Dairy Science, 68(1): 11-15, 1985.

173- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Synthesis of ester oligomer by Aspergillus niger lipase. Agricultural Biological Chemistry, 48(11): 2805-2808, 1984.

174- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. Agricultural Biological Chemistry, 40(4): 655-660, 1976.

175- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Purification and properties of partial glyceride hydrolase of Penicillium cyclopium M. Journal Biochemistry, Vol. 87(1): 205-211, 1980.

176- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agricultural Biological Chemistry, 45(1): 185-189, 1981.

177- OMAR, I.C.; SAEKI, H.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Synthesis of acetone glycerol acyl esters by immobilized lipase of Mucor miehei. Biotechnology Letters, Vol. 11(3): 161-166, 1989.

178- OSADA, K.; TAKAHASHI, K.; HATANO, M. Polyunsaturated fatty glyceride synthesis by microbial lipases. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(12): 921-922, 1990.

179- OSTERBERG, E.; BLOMSTRON, A.C.; HOLMBERG, H. Lipase-catalyzed transesterification of unsaturated lipids in a microemulsion. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 66(9): 1330-1333, 1989.

180- PAL, N.; DAS, S.; KUNDU, A.K. Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of Aspergillus niger. Journal Fermentation Technology, Vol. 56(6): 593-598, 1978.

181- PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Biotecnologia na produção de derivados de óleos e gorduras. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 23(3/4): 161-168, 1989.

182- PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 9(2): 167-171, 1989.

183- PARK, Y.K.; PASTORE, G.M.; ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by a combined lipase system. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(2): 252-254, 1988.

184- PAQUETTE, G.J.; McKELLAR, R.C. Optimization of extracellular lipase activity from Pseudomonas fluorescens using a super-simplex optimization program. Journal of Food Science, Vol. 51(3): 655-658, 1986.

185- PARRY, R.M.; CHANDAN, R.C.; SHAHANI, K.M. Rapid and sensitive assay for milk lipase. Journal of Dairy Science, 49: 356-360, 1966.

186- PETROVIC, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; VUJICIC, I.F.; BANKA, L. Biotechnology Letters, vol. 12(4): 299-304, 1990.

187- PIAZZA, G.; BILYK, A.; SCHWARTZ, D.; HAAS, M. Lypolysis of olive oil and tallow in an emulsifier-free two-phase system by the lipase from Oat seeds (Avena sativa L.). Biotechnology Letters, Vol. 11(7): 487-492, 1989.

188- POSORSKE, L.H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(11): 1758-1760, 1984.

189- POSORSKE, L.H.; LEFEBRE, G.K.; MILLER, C.A.; HANSEN, T.T.; GLENNIG, B.L. Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 922-926, 1988.

190- POTTS, R.H.; MUKERHEIDE, V.J. In Fatty Acids and Their Industrial Application. Editado por E. Scott Pattison, Marcel Dekker Inc., NY., 1968.

- 191- PRONK, W.; KERKHOF, P.J.A.M.; van HELDEN, C.; van TRIET, K. The hydrolysis of triglycerides by immobilized lipase in a hydrophilic membrane reactor. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 32, 512-518, 1988.
- 192- QUINLIN, P.; WEISER, H.J. Separation and determination of mono-, di- and triglycerides in monoglycerid concentrates. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 35(7): 325-327, 1958.
- 193- QUINN, J.C.; SAMPUGNA, J.; JENSEN, R.G. Synthesis of 100-gram quantities of highly purified mixed acid triglycerides. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 44: 439-442, 1967.
- 194- RAJAMANI, S.; HILDA, A. Plate assay to screen fungi for proteolytic activity. Current Science, Vol. 56, N° 22, November 20, 1987.
- 195- RANSAC, S.; ROGALSKA, E.; GARGOURI, Y.; DEVEER, A.M.T.; PALTANY, F.; HAAS, G.H.; VERGER, R. Stereo selectivity of lipases. I. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265(33): 20263-20270, 1990.
- 196- RATTRAY, J.B.M. Biotechnology and the Fats and Oils industry - An overview. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(11): 1701-1712, 1984.

- 197- RENARD, G.; GRIMAUD, J.; EL ZANT, A.; PINA, M.; GRAILLE, J. An improved method for the colorimetric assay of lipase activity using an optically clear medium. Lipids, Vol. 22(7): 539-541, 1987.
- 198- RIJAI, M.A. A revision of the Genus Trichoderma. Micological Papers (116), 1969.
- 199- RIVERA, M.G.; VALENCIA, T.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. Biotechnology Letters, Vol. 13(4): 277-280, 1991.
- 200- RIZACK, M.A. An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, 236(3): 657-662, 1961.
- 201- ROGALSKA, E.; RANSAC, S.; VERGER, R. Stereo selectivity of lipases. II. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265(33): 20271-20276, 1990.
- 202- RUCKA, M.; TURKIEWICZ, B.; ZUK, J.S. Polymeric membranes for lipase immobilization. Journal of American Oil Chemist's Society, vol. 67(12): 887-889, 1990.
- 203- SAMPUGNA, J.; JENSEN, R.G. Suitability of Geotrichum candidum lipase for the stereospecific analysis of some triglycerides. Lipids, Vol. 3(6): 519-529, 1968.

204- SAMPUGNA, J.; QUINN, J.G.; PITAS, R.E.; CARPENTER, D.L.; JENSEN, R.G. Digestion of butyrate glycerides by pancreatic lipase. Lipids, Vol. 2(5): 397-402, 1967.

205- SATO, T.; KAWANU, S.; IWAMOTO, M. Near infrared spectral patterns of fatty acid. Analysis from fats and oils. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(11): 827-833, 1991.

206- SCHMID, R.D. Biotechnology: Application to oleochemistry. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 64(4): 1987.

207- SCHWORTZ, D.P.; GADJEVA, D.G. A simple method for the quantitative isolation and resolution of unesterified fatty acids from fats and oils. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(3): 378-380, 1988.

208- SEINO, H.; UCHIBORI, T. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) Esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 61(11): 1984.

209- SEO, C.W.; YAMADA, Y.; OKADA, H. Synthesis of fatty acid esters by Corynebacterium sp S-401. Agricultural Biological Chemistry, 46(5): 405-409, 1982.

- 210- SERVAT, F.; MONTET, D.; PINA, M.; GALZY, P.; ARNAULD, A.; LEDON, H.; MARCON, L.; GRAILLEY, J. Synthesis of fatty hydroxamic acids catalyzed by the lipase of Mucor miehei. Journal of American Oil Chemist's Society, vol. 67(10): 646-649, 1990.
- 211- SEVERSON, D.L.; KHOO, J.C.; STEINBERG, D. Role of phosphoprotein phosphatases in reversible deactivation of chicken adipose tissue hormone-sensitive lipase. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 252(4): 1484-1489, 1977.
- 212- SVENSSON, I.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Interesterification of phosphatidylcholine with lipases in organic media. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 17(4): 262-264, 1990.
- 213- SHIPE, W.F. A study of the relative specificity of lipases produced by Penicillium roqueforti and Aspergillus niger. Archives Biochemistry, 30: 165-179, 1951.
- 214- SHAW, J.; CHANG, R.C.; WANG, F.F.; WANG, Y.J. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. Biotechnology and Bioengineering, vol. 35: 132-137, 1990.
- 215- SHAW, J.F.; CHANG, C.H. Characterization of three distinct forms of lipolytic enzyme in a commercial Candida lipase preparation. Biotechnology Letters, vol. 11(11): 779-784, 1989.

216- SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antoine van Leenwenhoek, 23(1): 15-22, 1957.

217- SMABY, J.M.; BROCKMAN, H.L. Regulation of cholesteryl oleate and triolein miscibility in monolayers and bilayers. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 262, No 17, 1987.

218- SMABY, J.M.; BROCKMAN, H.L. Miscibility, chain packing and hydration of 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine and other lipids in surface phases. Biophysics Journal, Vol. 48, 701-708, 1985.

219- SMABY, J.M.; BROCKMAN, H.L. Acyl unsaturation and cholesteryl ester miscibility in surfaces. Formation of lecithin-cholesteryl ester complexes. Journal of Lipid Research, Vol. 28, 1078-1087, 1987.

220- SMALL, C.A.; GARTON, A.J.; YEAMAN, A.J. Evidence for the presence of hormone-sensitive lipase in heart muscle. Biochemical Society Transation, Vol. 16(6): 1038-1039, 1988.

221- SOHN, H.D.; CHUNG, S.S.; RHEE, J.S. Deactivation of Candida rugosa lipase. Biotechnology Letters, Vol. 9(2): 117-122, 1987.

- 222- SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J. Lipase activity of Mucor pusillus. Applied Microbiology, Vol. 16(4): 617-619, 1968.
- 223- SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J.; SOMKUTI, A.C. Lipase of Mucor pusillus. Applied Microbiology, Vol. 17(4): 606-610, 1969.
- 224- SONNET, P.; ANTONIAN, E. Synthesis and evaluation of pseudolipids to characterize lipase selectivities. Journal Agricultural of Food Chemistry, 36: 856-862, 1988.
- 225- SONNET, P.E. Lipase selectivities. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65, No 6, June 1988.
- 226- SONNTAG, N.O.V. Esterification and interesterification. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 56: 751-754, November 1979.
- 227- SORHAUG, T.; ORDAL, Z.J. Cell-bound lipase and esterase of Brevibacterium linens. Applied Microbiology, 607-608, 1974.
- 228- SRIDHAR, R.; LAKSHMINARAYANA, G.; KAIMAL, T.N.B. Modification of selected Indian vegetable fats into cocoa butter substitutes by lipase-catalyzed ester interchange. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(10): 726-730, 1991.

- 229- STEAD, D. Microbial lipases: Their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. Journal of Dairy Research, 53, 481-505, 1986.
- 230- STEVENSON, R.W.; LUDDY, F.E.; ROTHBART, H.L. Enzymatic acyl exchange to vary saturation in di- and triglycerides. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 56: 676-680, 1979.
- 231- SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. Production of exogenous lipases by fungi and actinomycetes. Enzyme Microbiology Technology, Vol. 10: 492-497, 1988.
- 232- SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of Penicillium citrinum. Biotechnology Letters, Vol. 11(12): 895-898, 1989.
- 233- SZTAJER, H.; ZBOJNSKA, E. Microbial lipases in biotechnology. Acta Biotechnology, 8(2), 169-175, 1988.
- 234- TAHOUN, M.K.; EL KADEY, F.; WAHBA, A.A. Hydrolysis of synthetic and natural triglycerides by an intracellular lipase from Aspergillus niger. Fat Science Technology, 9: 261-263, 1987.
- 235- TAKAHASHI, K.; SAITO, Y.; INADA, Y. Lipase made active in hydrophobic media. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 65(6): 911-916, 1988.

236- TANAKA, T.; ONO, E.; ISHIHARA, M.; YAMANAKA, S.; TAKINAMI, K. Enzymatic acyl exchange of triglyceride in n-Hexane. Agricultural Biological Chemistry, 45(10), 2387-2389, 1981.

237- TAYLOR, F. Stabilization of lipase from Thermomyces lanuginosus with p-chloromercuribenzoic acid. Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol. 68(2): 141-143, 1989.

238- TORNQVIST, H.; BELFRACE, P. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, Vol. 251(3): 813-819, 1976.

239- TOTANI, Y.; HARA, S. Preparation of polyunsaturated phospholipids by lipase-catalyzed transesterification. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(11): 848-851, 1991.

240- TRANI, M.; ERGAN, F.; ANDRE, G. Lipase-catalyzed production of wax esters. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(1): 20-25, 1991.

241- TSUJITA, T.; BROCKMAN, H.L. Regulation of carboxylester lipase adsorption to surfaces. I. Chemical specificity. Biochemistry, Vol. 26: 8423-8429, 1987.

242- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. A comparative study on some properties of fungal lipases. Proceedings of IV International Fermentation Symposium, 315-320, 1972.

243- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, crystallization and some properties of lipase from Geotrichum candidum Link. Agricultural Biological Chemistry, 37(6): 1457-1464, 1973.

244- TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 489: 415-422, 1977.

245- TSUZUKI, W.; SUZUKI, T. Reactive properties of the organic solvent soluble lipase. Biochimica et Biophysica Acta, 1083: 201-206, 1991.

246- UÇAR, T.; EKİZ, H.I.; CAGLAR, M.A. Surface effects of solvents in hydrolysis of water-soluble lipids by Candida lipase. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 33: 1213-1218, 1989.

247- UPADHYAY, C.M.; NEHETE, P.N.; KOTHARI, R.M. A lipase preparation with dual pH optima, wide temperature optima and broad substrate specificity for multiple applications. Biotechnology Letters, Vol. 11(11): 793-796, 1989.

- 248- VADEHRA, D.V. Staphylococcal lipases. Lipids, Vol. 9(3): 158-165, 1974.
- 249- VAN der PADT, A.; EDEMA, M.J.; SEWALT, J.J.W.; VAN'T RIET, K. Enzymatic acylglycerol synthesis in a membrane bioreactor. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 67(6): 1990.
- 250- VAUGHAN, M.; BERGER, J.E.; STEINBERG, D. Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, 239(2): 401-409, 1964.
- 251- VEERARAGAVAN, K.; GIBBS, B.F. Detection and partial purification of two lipases from Candida rugosa. Biotechnology Letters, Vol. 11(5): 345-348, 1989.
- 252- VERGER, R.; HAAS, G.H.; SARDA, L.; DESNUELLE, P. Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. Biochimica et Biophysica Acta, 188: 272-282, 1969.
- 253- VIRTO, M.D.; LASCARAY, J.M.; SOLOZABAE, L.; RENOBLES, M. Enzymic hydrolysis of animal fats in organic solvents at temperatures below their meeting points. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 68(5): 324-327, 1991.

- 254- WANG, Y.J.; SHEU, J.Y.; WANG, F.F.; SHAW, J.F. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnology and Bioengineering, Vol. 31(6): 628-633, 1988.
- 255- WATANABE, N.; OTA, Y.; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agricultural Biological Chemistry, 41(8), 1353-1358, 1977.
- 256- WINGENDER, J.; VOLZ, S.; WINKLER, U.K. Interaction of extracellular Pseudomonas lipase with alginate and its potential use in biotechnology. Applied Microbiology, 27: 139-145, 1987.
- 257- YAMAGUCHI, T.; MUROYA, N.; ISOBE, M.; SUGIURA, M. Production and properties of lipase from a newly isolated Chromobacterium. Agricultural Biological Chemistry, 37(5), 999-1005, 1973.
- 258- YAMANE, T.; FUNADA, T.; ISHIDA, S. Repeated use of lipase immobilized on amphiphilic gel for hydrolysis of a small amount of glycerides included in liquid crude fatty acid. Journal Fermentation Technology, Vol. 60, No 6, p. 517-523, 1982.
- 259- YANG, D.; RHEE, J.S. Stability of lipase immobilized on DEAE-Sephadex for continuous lipid hydrolysis in organic solvent. Biotechnology Letters, Vol. 13(8): 553-558, 1991.

260- YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. Physical and chemical properties of lipase from Torulopsis ernobii. Biochimica et Biophysica Acta, 154: 586-588, 1968.

261- YOSHIDA, F.; MOTAI, H.; ICHISHIMA, E. Effect of lipid materials on the production of lipase by Torulopsis ernobii. Applied Microbiology, Vol. 16(6): 845-847, 1968.

262- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. Enzymatic catalysis in organic media at 100°C. Science, Vol. 224: 1249-1251, 1984.

263- ZLATANOS, S.N.; SAGREDDOS, A.N.; PAPAGEORGIOU, P. High yield monoglycerides preparation from glycidol and carboxylic acids. Journal of American Oil Chemist's Society, Vol. 62, N° 11, 1985.

264- ZUBENKO, T.F.; SULTANOVA, I.G.; ZAKIROV, M.Z. Growth and lipolytic activity of Rhizopus microsporus cultured at different temperatures. Mikrobiologiya, Vol. 53(1): 50-53, 1984.