

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
BIOQUÍMICA DE LIPASE DE UMA NOVA LINHAGEM DE
Rhizopus sp.

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Mestre
em Ciência da Nutrição.**

PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defen-
dida por VINICIUS DOS SANTOS
RIBEIRO DA COSTA e aprovada
pela Comissão Julgadora em -
28.04.97.

Campinas, 28 de abril de 1997


Profa. Dra. GLÁUCIA M. PASTORE
Presidente da Banca

Vinicius dos Santos Ribeiro da Costa.
Nutricionista

Profª. Drª. Gláucia Maria Pastore
Orientadora

Campinas-SP
1997

UNIDADE	80
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	32603
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	30/10/98
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C823p

Costa, Vinícius dos Santos Ribeiro da
Produção, purificação e caracterização bioquímica de
lipase de uma nova linhagem de *Rhizopus sp.* / Vinícius dos
Santos Ribeiro da Costa. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lipase. 2.Rhizopus. I.Pastore, Gláucia Maria.
I.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

CM-00104796-3

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Gláucia Maria Pastore
(orientadora)



Prof. Dr. Jaime Amaya Farfán
(membro)

Prof. Dr. Walter Esteves
(membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
(membro)

Campinas, de de 1997.

*'A Rosângela, Josecassy, Maria Carolina e Iris Eduarda,
pelo apoio e incentivo nesses anos de vindas e voltas.
Dedico.*

*Se um homem começar com certezas, vai terminar com dúvidas.
Se por ventura começar com dúvidas, alcançará as certezas.*

(Sir Francis Bacon)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir a minha existência.

Aos meus pais, que me deram a vida biológica

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela valiosa orientação no decorrer deste trabalho, e pela sua amizade.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela disponibilidade sempre atenciosa.

Aos amigos e funcionários da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos pelo apoio.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação, Magareth e Cristiane pela disponibilidade com que me atenderam.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos pelo auxílio, sempre que solicitados.

À Maria das Dores Oliveira pela amizade e colaboração, em todos os momentos em que as dificuldades ameaçaram interromper esta conquista.

À Lídia Cruz Neyra por ajudar-me a superar obstáculos e realizar tarefas.

Aos amigos Contado, Marjorie, Cristine, Maricy, Enilene, Márcia, Jussara, Marcolino, Ila, Michel e Masaharu pela atenção e auxílio dedicados.

Àquelas que por um longo período me permitiram a convivência, as amigas Márcia Madeira, Miriam e Sandra.

À todos aqueles que por ventura não foram mencionados, agradeço por terem feito parte de uma longa jornada da minha vida. Serão sempre lembrados.

ÍNDICE GERAL

	página
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMO	viii
SUMMARY	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Materiais	24
3.1.1 Reagentes e Materiais Específicos	24
3.1.2 Equipamentos	25
3.2 Métodos	27
3.2.1 Produção da Enzima	27
3.2.1.1 Preparo do Inóculo	27
3.2.1.2 Fermentação Semi-sólida	27
3.2.1.3 Extração da Enzima	27
3.2.2 Fracionamento com sulfato de amônio	28

3.2.3	Determinação da Atividade Lipolítica da Enzima Bruta	29
3.2.3.1	Determinação da Atividade Enzimática nos Substratos Óleo de Oliva, Gordura de Côco, Gordura do Leite de Cabra e Óleo de Mamona	29
3.2.3.2	Determinação da Atividade Enzimática em Substrato p-Nitrofenil-Laurato (PNPL).	29
3.2.3.2.1	Preparação do Substrato Sintético p-Nitrofenil-Laurato	29
3.2.3.2.2	Preparação do Sistema de Reação com Substrato Sintético p-Nitrofenil-Laurato (PNPL)	30
3.2.3.3	Determinação do Número de Saponificação	30
3.2.4	Caracterização Bioquímica da Lipase Bruta no substrato Óleo de Oliva	31
3.2.4.1	Efeito do pH na atividade da enzima	31
3.2.4.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima	32
3.2.4.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima	32
3.2.4.4	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	33
3.2.4.5	Efeito da interferência de íons na atividade da enzima	33
3.2.5	Purificação da Enzima	34
3.2.5.1	Cromatografia em coluna de DEAE-SEPHADEX A-50	34
3.2.5.2	Dosagem de proteína pelo método de Lowry	35
3.2.6	Caracterização Bioquímica da Lipase Bruta e Parcialmente Purificada Utilizando Substrato p-Nitrofenil-Laurato (PNPL).	35

3.2.6.1	Efeito do pH na Atividade da Enzima	35
3.2.6.2	Efeito do pH na Estabilidade da Enzima	35
3.2.6.3	Efeito da Temperatura na Atividade da Enzima	36
3.2.6.4	Efeito da Temperatura na Estabilidade da Enzima	36
3.2.6.5	Efeito da Concentração do Substrato PNPL na Atividade da Enzima	36
3.2.7	Determinação da Porcentagem de Hidrólise utilizando- se os Substratos Óleo de Oliva e Gordura de Côco em Relação ao Tempo de Reação	37
3.2.8	Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Hidrólise da Lipase Bruta e Parcialmente Purificada (F I e F II) de <i>Rhizopus sp.</i>	38
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	Produção da lipase em meio semi sólido	39
4.1.1	Purificação da enzima em cromatografia de coluna em DEAE-Sephadex.	40
4.2	Determinação da atividade lipolítica em óleo de oliva, gordura de côco e gordura de leite de cabra.	45
4.3	Caracterização bioquímica da lipase bruta em substrato óleo de oliva.	46
4.3.1	Efeito do pH na atividade da enzima	46
4.3.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima	47
4.3.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima	49
4.3.4	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	50
4.3.5	Estudo da interferência de íons na atividade da enzima utilizando substrato óleo de oliva.	52

4.4	Caracterização bioquímica da lipase bruta e parcialmente purificada utilizando-se como substrato PNPL.	53
4.4.1	Efeito do pH na atividade da enzima	53
4.4.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima	55
4.4.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima	56
4.4.4	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	57
4.4.5	Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima	59
4.5	Determinação da porcentagem da hidrólise em diferentes substratos, em relação ao tempo de reação.	61
5	CONCLUSÕES	68
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABELA

	página
Tabela 1 - Purificação parcial da lipase de <i>Rhizopus sp.</i> linhagem 14	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1 - Fluxograma da produção e purificação da lipase de <i>Rhizopus sp.</i>	42
Figura 2 - Cromatografia da lipase de <i>Rhizopus sp.</i> em coluna de DEAE- Sephadex A-50	43
Figura 3 - Ação hidrolítica da lipase de <i>Rhizopus sp.</i> sobre diferentes substratos.	46
Figura 4 - Efeito do pH na atividade da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato óleo de oliva.	47
Figura 5 - Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato óleo de oliva.	49
Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato óleo de oliva.	50
Figura 7 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato óleo de oliva.	51
Figura 8 - Efeito da interferência de íons cálcio e magnésio na atividade da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	53
Figura 9 - Efeito do pH na atividade da lipase bruta e parcialmente purificada(fração I e fração II) de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil-laurato.	54
Figura 10 - Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta e parcialmente purificada(fração I e fração II) de <i>Rhizopus sp.</i> em substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil-laurato.	56
Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta e	

parcialmente purificada(fração I e fração II) de <i>Rhizopus</i> <i>sp.</i> em substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil-laurato.	57
Figura 12 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta e parcialmente purificada (fração I e fração II) de <i>Rhizopus</i> <i>sp.</i> em substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil-laurato.	59
Figura 13 - Efeito da concentração do substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil- laurato na atividade da lipase de <i>Rhizopus sp.</i> (Fração I).	60
Figura 14 - Efeito da concentração do substrato sintético <i>p</i> -nitrofenil- laurato na atividade da lipase de <i>Rhizopus sp.</i> (Fração II).	61
Figura 15 - Efeito do tempo de reação na hidrólise de diferentes substratos pela ação da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	63
Figura 16 - Efeito do tempo de reação na hidrólise dos substratos gordura de côco e óleo de oliva pela ação da lipase bruta de <i>Rhizopus sp.</i>	63
Figura 17 - Cromatografia em Camada Delgada (TLC), dos produtos da hidrólise em substrato óleo de oliva pela ação da lipase bruta e parcialmente purificada (Fração I e Fração II) de <i>Rhizopus sp.</i>	65
Figura 18 - Cromatografia em Camada Delgada (TLC), dos produtos da hidrólise em substrato gordura de côco pela ação da lipase bruta e parcialmente purificada (Fração I e Fração II) de <i>Rhizopus sp.</i>	67

RESUMO

Nas últimas décadas as Indústrias de Alimentos e Farmacêutica, têm demonstrado grande interesse na aplicação potencial de lipases de diferentes fontes como as de origem animal, as lipases de plantas e especialmente as lipases microbianas por sua capacidade de produção e especificidade.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo caracterizar bioquimicamente uma lipase fúngica de uma linhagem de *Rhizopus* ainda não relatada na literatura.

A lipase de *Rhizopus sp.* linhagem nº 14, isolado no laboratório de Bioquímica de Alimentos do Departamento de Ciências de Alimentos (FEA/UNICAMP), foi produzida em meio semi-sólido constituído de farelo de trigo e água na proporção 60 / 40 (p/v). Esta linhagem foi escolhida por ter sido a que melhor produziu a enzima neste meio de fermentação.

O extrato enzimático bruto ou lipase bruta foi extraído do meio após 120 horas de incubação a 30°C, por precipitação em sulfato de amônio.

A atividade lipolítica foi testada contra os substratos gordura de côco, óleo de oliva, óleo de mamona, gordura do leite de cabra e o substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato.

A enzima mostrou maior atividade para hidrolisar gordura de côco, frente aos outros substratos.

O extrato enzimático bruto foi parcialmente purificado em coluna de DEAE-Sephadex A-50, sendo obtidas duas frações, as quais foram

submetidas a testes bioquímicos para a caracterização de suas propriedades em substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato.

As frações apresentaram um perfil de atividade em temperatura na faixa de 40 a 55°C e temperatura de estabilidade na faixa de 24 a 40°C, e, pH ótimo de 6,0 a 6,5 e mostraram-se estáveis na faixa de pH de 5,6 a 7,5, semelhante a enzima bruta.

subprodutos indesejáveis como ácidos graxos poliinsaturados polimerizados, e cetonas e hidrocarbonetos produzidos.

Uma das saídas viáveis para a indústria é a utilização de enzimas hidrolíticas, principalmente as de origem microbiana, porque podem ser facilmente produzidas em relação as de vegetais e animais, com utilização de substrato de baixo custo e necessitam curto tempo para produção.

As lipases compreendem um grupo de enzimas classificadas como hidrolases (E.C. 3.1.1.3), e também são conhecidas como Acilglicerol, Acilhidrolases ou Glicerol Éster Hidrolase. Sua função biológica é a hidrólise de ésteres de ácido graxo e glicerol resultando na formação de diglicerídeos, monoglicerídeos e ácidos graxos. Estas enzimas atuam de modo reversível, catalisando também a esterificação de ácidos graxos e glicerol produzindo diversos glicerídeos. Este tipo de reação ocorre na interface óleo/água, característica esta peculiar às lipases que são solúveis em água e atuam em substratos não solúveis em água, sendo necessária entretanto a interação lipase-lipídeo de modo que resulte na emulsificação entre o substrato lipídico e a água na qual a lipase está dissolvida. A hidrólise ocorrerá devido a uma orientação ideal da enzima onde a parte hidrofílica se dirige para fora (água) e parte hidrofóbica para o interior (óleo).

Esta capacidade difere a lipase da ação de esterase que atuam preferencialmente em substratos solúveis. (**MACRAE & HAMMED**, 1985).

Uma das principais formas de utilização das lipases é a hidrólise de óleos vegetais, conforme sua especificidade, podendo clivar as posições 1,2 ou 2,3 do triacilglicerol ou ainda pelo tamanho da cadeia dos ácidos graxos.

Para aplicação industrial, um número expressivo de lipases já vem sendo utilizadas como por exemplo na Indústria de Laticínios onde ácidos graxos de cadeia curta são hidrolisados para desenvolver um tipo de “flavor”

em alguns queijos ou leites modificados, podendo ainda ser utilizada para mudar as propriedades físicas de óleos naturais para atender os propósitos da indústria de alimentos na conversão destes óleos em margarinas, ou dar origem a produtos especiais com baixo valor calórico produzidos a partir de ácidos graxos de cadeia média ou pequena.

O conhecimento do potencial hidrolítico destas lipases poderá fazer com que se utilize óleos mais baratos para conseguir análogos de características sensoriais e funcionais semelhantes.

Este estudo teve como objetivo caracterizar bioquimicamente uma lipase de fungo *Rhizopus sp.* ainda não relatada na literatura, visando conhecer quais as melhores condições para a atividade desta enzima tornando-a viável para aplicação industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

NAGAOKA et alii 1969, estudaram a produção de lipases por linhagem isolada de *Mucor sp*. O microrganismo foi cultivado em meio líquido composto por 4% de amido solúvel, 3% de farelo de soja, 0,1%(NH₄)₂SO₄ e 0,2% de K₂HPO₄, pH 6.5. A produção de lipase mostrou ser afetada pela fonte de nitrogênio do meio sendo a combinação de (NH₄)₂SO₄ e farelo de soja a mais adequada. A enzima apresentou pH ótimo de 8.0 em óleo de oliva como substrato a 37°C.

Em 1970 realizando estudos sobre lipases fúngicas, **IWAI et alii** verificaram os efeitos das formas iônicas de ferro sobre a lipase de *Aspergillus niger*. Esta lipase foi obtida através de um processo denominado Processo Koji. Neste processo é obtido de um extrato aquoso a partir do farelo de trigo, e posteriormente a enzima é purificada e cristalizada. Os autores observaram que ocorria uma diminuição da atividade da lipase quando se dialisava contra água destilada durante o processo de purificação. Ao investigar este fenômeno foram encontradas pequenas quantidades de íons ferroso e férrico na água de diálise que exerciam uma forte inibição na atividade da lipase. Testes realizados com adição de íons ferro durante a reação não demonstraram inibição, entretanto, quando estes foram adicionados antes de começar a reação observou-se um grande efeito inibitório. Os autores constataram que na presença de ácidos graxos os íons ferro não inibem a atividade de lipase que tiverem sua concentração aumentada durante a hidrólise. Também observaram dois tipos de inativação: reversível, quando o contato da lipase com pequenas quantidades de ferro, por um curto período de tempo, e, irreversível quando o contato com grandes quantidades de íons ferro por longos períodos de tempo.

Verificaram também que a inibição da reação de esterificação requereu mais íons ferro do que para a reação de hidrólise.

TSUJISAKA et alii 1972, realizaram estudos comparativos com algumas lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. *Aspergillus niger* produziu lipase especialmente em meio sólido constituído de farelo de trigo e CaCO_3 , enquanto que os outros produziram grande quantidade de lipase em meio líquido. A principal característica deste meio foi a alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono. Para *Penicillium cyclopium*, o meio mais adequado era constituído de farelo de arroz e água de maceração de milho. De acordo com os Autores, todas as lipases produzidas podem ser definidas como Glicerol Éster Hidrolases (E.C. 3.1.1.3), devido à sua ação catalítica.

A presença de íons cálcio ativou todas as enzimas enquanto que todas foram inativadas por íons férrico e ferroso. Sobre a ativação da lipase de *Aspergillus niger*, verificou-se que esta característica não ocorreu no início da reação enzimática sobre óleo oliva, porém após o acúmulo de determinada quantidade de ácido oléico, a ativação foi induzida e a reação acelerada. Este fenômeno foi observado somente no caso de hidrólise de triacilglicerol composto de ácido graxo de cadeia longa. Portanto, a ativação parece depender do estado de emulsificação da mistura de reação pela formação de sais de cálcio com ácidos graxos livres. A ação das lipases foi verificada pela produção da mono, di e triglicerídeos. Das lipases estudadas, as de *Rhizopus delemar* e *Aspergillus niger* demonstraram melhor especificidade para vários ácidos graxos e grande atividade de síntese em relação as outras duas.

Uma lipase de *Aspergillus flavus* que hidrolisa óleo de côco, foi isolada e purificada por **HOOVER et alii** 1973, por precipitação com sulfato

de amônio e cromatografia em DEAE-Celulose e Sephadex G-200 a enzima foi purificada 109 vezes. Foi encontrado um pH de 6,2 como pH ótimo de atividade. Os ácidos graxos dos triacilgliceróis de cadeia curta foram mais rapidamente hidrolisados, enquanto que a hidrólise de triestearina não foi detectada sob as condições do ensaio. Utilizou-se cromatografia de camada delgada para analisar os produtos da hidrólise de óleo de côco e foram encontrados os seguintes ácidos graxos: oléico, palmítico, láurico, caprílico, capróico e cáprico.

BENZONANA 1974, descreveu algumas propriedades de uma lipase extracelular de *Rhizopus arrhizus*. A lipase quando purificada em coluna de AMBERLITE IRC 50 foi separada em dois picos chamados lipase I e II. A adição de 2mM de diisopropilfosfofluoridrato (DFP) para o meio de incubação contendo lipase, interrompeu a formação de lipase II. O autor concluiu desta forma que a lipase II é o resultado da degradação proteolítica da lipase I e não excretada pelo fungo como lipase II. Os pesos moleculares das duas enzimas são dados como 40000 e 30000 para as lipases I e II, respectivamente. Titulações de açúcares neutros sobre frações eluídas da coluna, mostram que a lipase I é rica em carboidratos, sendo que a lipase II não apresenta esta característica. A lipase mostrou uma especificidade posicional sobre triglicerídeos de cadeia longa similar à lipase pancreática, rompendo as ligações éster nas posições 1,3.

Três tipos de lipases de *Rhizopus delemar* foram purificadas e suas propriedades estudadas por **IWAI & TSUJISAKA** em 1974 que objetivaram seus estudos em verificar as diferentes condições de atividade destas lipases produzidas por um mesmo microrganismo. As lipases foram separadas e purificadas em coluna e classificadas em (A, B e C) e caracterizadas quanto ao pH ótimo de atividade, pH de estabilidade,

temperatura de atividade e de estabilidade. Foi observado como melhor pH de atividade 5,6 para as três lipases, sendo a lipase **A** estável na faixa de 3,0 a 8,0, enquanto que as lipases **B** e **C** foram mais estáveis em torno de pHs 4,0 a 7,0. As temperaturas ótimas de atividade foram 30°C para lipase **A** e 35°C para as lipases **B** e **C** e estas, por sua vez, foram estáveis à temperaturas abaixo de 45°C; enquanto que a lipase **A** permaneceu estável até 60°C. Todas as lipases apresentaram atividade catalítica similar, e a atividade lipolítica foi determinada em um sistema de reação constituído de óleo de oliva e submetidos a incubação a 30°C por 60 minutos. Os Autores concluíram que a lipase **A** diferiu das outras duas na sua estrutura protéica.

IWAI et alii em 1975, purificaram e caracterizaram duas lipases obtidas em meio semi-sólido, utilizando *Penicillium cyclopium*, comparando suas propriedades. As análises foram realizadas por sistemas de reação iguais entretanto usando ou não agitação.

As lipases foram purificadas com sulfato de amônio a 70% de saturação, e o precipitado foi dissolvido em água deionizada, da solução resultante foi retirado o sal em coluna de Sephadex G-25, e posteriormente concentrada em diálise contra polietileno glicol.

O pH de estabilidade foi determinado utilizando tampão McIlvain pH 3,0-8,0 e 1ml da solução de enzima contendo 30U/ml. A lipase **A** foi estável entre 6,5 a 9,0 e a lipase **B** em pH um pouco mais ácido em torno de 4,0-6,5. A estabilidade térmica para ambas as lipases foi a 35°C por 15min. A atividade sob diferentes condições com agitação e sem agitação, não mostrou diferenças para a lipase **A**. Entretanto, a lipase **B** foi mais ativa quando submetida à agitação.

O pH ótimo de atividade foi determinado pelos dois métodos, usando a agitação de 500 oscilações/min por 60min a 30°C e diferentes pHs.

As lipases deram pHs ótimos de 7,0 e 6,0 para A e B respectivamente. Pelo método sem uso da agitação (stand method), por 60min a 30°C os resultados foram: pH 8,0 para lipase A e 5,5 para lipase B.

Também foram testadas quanto a especificidade sobre vários óleos vegetais, e não houve diferença significativa para ambas as lipases.

Os autores concluíram que as diferenças nos pHs de estabilidade e ótimo destas lipases são pertinentes ao tipo e forma da proteína que as compõem.

OKUMURA et alii 1976, estudaram as especificidades posicionais de quatro espécies de lipases microbianas: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Pela 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 triacilglicerol. Quando dioleína foi utilizada como substrato, estas duas lipases hidrolisaram 1,3-dioleína de *G. candidum* em preferência à 1,2 (2,3) dioleína. As lipases *P. cyclopium* hidrolisaram todas as ligações ésteres independentemente de sua posição no triacilglicerol.

TSUJISAKA et alii 1977, estudaram a reação inversa catalisada pelas lipases. A reação de esterificação foi estudada utilizando-se quatro lipases microbianas obtidas de *Aspergillus niger* NRRL-337, *Rhizopus delemar* ATCC-34612, *Geotrichum candidum* ATCC-34614 e *Penicillium cyclopium* ATCC 34613. Estas enzimas foram purificadas até a homogeneidade e estudadas quanto às suas propriedades. O sistema de reação para a síntese de glicerídeos foi constituído de 4 ml de glicerol, 1 ml de água, 0,1 ml de enzima e 0,1 ml de ácido oléico. As quantidades de glicerídeos sintetizadas pelas lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium* foram inferiores em

cerca 10% em relação as quantidades sintetizadas pelas lipases de *A. niger* e *R. delemar* (60%).

AKTAR et alii 1980, puderam observar a influência de diferentes triacilgliceróis na indução da lipase de *Mucor hiemalis* onde o meio de crescimento do fungo continha peptona, minerais, glicose, óleo de oliva, gordura de côco e óleo de mostarda como fonte de carbono. Entre os triacilgliceróis testados, o componente do óleo de oliva foi o melhor indutor de lipase. Também foi observado que o melhor pH para atividade da lipase foi em torno 7,0, e que a mesma que foi induzida pelo óleo de oliva não apresentou atividade sobre o mesmo triglicerídeo, e este não a inibiu. A maior atividade da lipase foi encontrada sobre óleo de côco e sua especificidade não foi correlacionada quando este óleo foi emulsificado.

OKUMURA et alii 1981, estudaram a ação reversa da lipase na hidrólise de triglicerídeos. Foram utilizadas as lipases purificadas de *Aspergillus niger* NRRL-337, *Penicillium cyclopium* ATCC-34613, *Rhizopus delemar* ATCC34612, *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 triglicerídeo. Segundo os autores esta é a causa pela qual o grau de hidrólise desta lipase é o menor 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 de *A. niger* não é tão ativa na reação de esterificação. A lipase de *G. candidum* hidrolisa ligações éster em todas as posições do glicerol. Esta lipase apresentou a mais fraca ação de esterificação durante a hidrólise da trioleína dentre as quatro lipases estudadas. Este dado pode explicar o porque da lipase de *G. candidum* hidrolisar trioleína acima de 90% mais que as lipases

estudadas. A lipase de *P.cyclopium*. tem ação de esterificação e hidrólise semelhante a de *R. delemar*.

TANAKA et alii em 1981, utilizaram lipase de *Rhizopus delemar* para descrever a reação de interesterificação enzimática de óleo de oliva em meio n-Hexano. A enzima foi dissolvida em glicerol e 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 a areia celite e carbonato de cálcio mostraram-se mais eficientes.

TAHOUN et alii em 1982(a), estudaram a influência do meio de cultivo com diferentes fontes de carbono na indução de lipase por *Geotrichum candidum*. O microorganismo foi incubado a 30°C em meio de cultivo líquido composto de tripcase e minerais como base e contendo como fontes alternativas de carbono, glicose, óleo de oliva, ácido oléico ou Tween 80. A produção máxima de atividade lipolítica se deu quando o pH inicial do meio de cultivo foi de 5.5. Verificou-se que *G. candidum* produz significante quantidade de lipase extracelular na presença de glicose. A atividade de lipase, porém, é maior quando óleo de oliva é adicionado ao meio de cultivo. Tween 80 e ácido oléico inibiram fortemente a produção de lipase extracelular, havendo no entanto aumento na atividade lipolítica da lipase micelial de *G. candidum*.

Utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, **LINFIELD et alii** em 1984, estudaram a cinética de hidrólise em banha, óleo de côco e óleo de oliva e a esterificação do ácido oléico em glicerol. A melhor hidrólise ocorreu em óleo de oliva, e os resultados de hidrólise com *Aspergillus niger* foram semelhantes aos obtidos com

Candida rugosa. Ambas as lipases não apresentaram especificidade e foram capazes de hidrolisar todos os substratos em 72 horas. A temperatura de hidrólise em óleo de côco e oliva foram de 23°C e 27°C, e em banha foi de 43°C. A termoestabilidade da lipase de *Aspergillus niger* foi observada com sua inativação a 52°C. A lipase de *Rhizopus arrhizus* foi específica e hidrolisou triacilgliceróis mais lentamente que as duas lipases supracitadas. Os resultados de esterificação foram os mesmos para *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*. Utilizando cromatografia em camada delgada para analisar os produtos da hidrólise após 6 semanas apresentou o seguinte resultado: monoglicerídeos 1,4%, diglicerídeos 19,8%, triglicerídeos 43,6% e ácidos graxos 35,3%.

POSORSKE em 1984, relatou as aplicações da lipase na indústria de óleos e gorduras tendo verificado que as enzimas em geral têm vantagens no processo industrial, como por exemplo a especificidade que permite o controle dos produtos produzidos e também a possibilidade de controlar a síntese de produtos secundários não desejados, condições brandas de reação e redução do desperdício. A modificação enzimática de lipídeos tem sido usada na indústria na área de desenvolvimento de sabor e aroma em queijos, assim como lipolisados de gordura de leite para adicionar em alimentos processados. Estudos recentes têm demonstrado que as lipases possuem grande potencial de aplicação na indústria. Uma grande área de atuação das lipases é na síntese de ésteres. Apesar da reação de esterificação poder ser realizada quimicamente, a reação enzimática tem muitas vantagens, podendo ser realizada à baixas temperaturas. A lipase de *Rhizopus arrhizus* foi usada para esterificar ácidos graxos de cadeia longa e conseguiu-se 80% de esterificação em meio não aquoso. Outra área de aplicação é a interesterificação onde o objetivo é a troca de um ácido graxo da molécula do

triglicerídeo por outro ácido graxo presente no meio de reação. Como exemplo, a reação de interesterificação de trioleína com ácido palmítico.

A lipase usada foi de *Candida cylindracea* e *Mucor miehei*. O sucesso dos trabalhos mostra um grande caminho a ser investigado.

Os componentes do “flavor” encontrados no queijo tipo Camembert são as metilcetonas, ácidos graxos, álcoois, ésteres derivados de lípides, aminoácidos formados a partir da atividade enzimática do fungo *Penicillium camemberti*. Em 1985 **OKUMURA E KINSELLA**, estudaram a formação de metilcetonas por *Penicillium camemberti*, sendo estas os principais componentes encontrados em maior quantidade no queijo e responsáveis pelo sabor, e entre elas estão 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona e 2-undecanona os homólogos presentes em maior quantidade.

Ao adicionar a lipase em um sistema de reação composto de leite homogeneizado diluído com tampão fosfato a pH 6,8 e micélio de *Penicillium camemberti*, os autores observaram que a produção de carbonila foi significativamente maior e isto pode ter refletido em uma maior concentração de ácido graxo.

Em 1986, **TAHOUN et alii** estudaram a especificidade e a síntese de glicerídeos pela lipase de *Rhizopus delemar*, cultivado em meio líquido. A enzima intracelular foi isolada e purificada, e, a atividade medida por titulação dos ácidos graxos liberados da emulsão de óleo de oliva e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio. O ensaio de síntese de glicerídeos foi realizado em uma mistura constituído de: 4,0ml de glicerol, 1,0ml de tampão McIlvaine 0,3M a pH 6,1, e sob agitação de 300 oscilações a 30°C por 16 horas. Na purificação foram obtidas enzimas **A,B,C** designadas assim, conforme a sequência em que foram eluídas e a sequência da atividade

específica determinada sendo 720, 480 e 320 U/mg de proteína respectivamente para A, B e C lipases.

A eficiência das várias lipases para catalisar a síntese de glicerídeos a partir de diferentes ácidos graxos foi estudada para definir que ácido graxo seria melhor substrato para cada lipase em determinadas condições. A lipase “C” foi mais efetiva na síntese de glicerídeos, comparada as outras duas. Todas as lipases catalisaram preferencialmente a síntese de glicerídeos a partir de ácidos graxos de cadeia curta. A especificidade posicional indicou a incapacidade das enzimas para síntese de 1,2(2,3)-dioleína e trioleína no estágio inicial(8 horas), por outro lado após algum período, 1,3-dioleína foi o principal produto observado na placa de cromatografia.

Entretanto 1,2(2,3)-dioleína foi detectada após 16 horas em menor concentração que 1,3-dioleína, indicando que 1,2(2,3)-dioleína foi formada pela isomerização espontânea de 1,3-dioleína. Estes dados sustentam a idéia de incapacidade da lipase intracelular para reagir na posição 2 do glicerol, assim como no caso da lipase extracelular de *Rhizopus delemar*.

Em 1986, SUZUKI et alii estudaram uma lipase de *Rhizopus japonicus*, com respeito a sensibilidade desta a metais. A lipase foi purificada por cromatografia sobre hidroxipatita, octyl-Sepharose e Sephacryl S-200. Foi encontrado um peso molecular em torno de 30000 por SDS-PAGE e uma atividade específica de 68,900 U/mg proteína. A enzima catalisou a hidrólise de tricaprina e tricaprilina mais rapidamente do que outros triglicerídeos. Foi encontrado um pH ótimo ao redor de 5,0 e foi possível observar que a adição de albumina na mistura aumentava enormemente a atividade numa faixa de pH que variou entre 3,0 e 8,0. Os autores também observaram que a composição de ácidos graxos liberados a partir do óleo de linhaça foi semelhante àqueles liberados pela lipase pancreática.

A adição de sais biliares (colato e desoxicolato de sódio), tanto como íons metálicos não afetaram a atividade da enzima.

TAHOUN et alii em 1987, isolaram uma lipase intracelular de *Aspergillus niger*. A enzima foi purificada por cromatografia de filtração em gel sobre coluna de Sephadex- G 150. A atividade lipolítica sobre triglicerídeos (C10, C18) foi determinada em pH 6.0 a 30°C por 30 minutos. Dos resultados obtidos na hidrólise de triglicerídeos de gordura de leite, mono e diglicerídeos tiveram porcentagens de 9,5% e 13,8% respectivamente após 15 minutos; enquanto a máxima produção de ácidos graxos livres foi detectada após 30 minutos . Quantidades iguais de 1,2 (2,3) diglicerídeos foram quatro vezes maior que 1,3 diglicerídeos. A razão para a produção de 1,3 diglicerídeos após 5 minutos, pode ser explicada segundo os autores pela isomerização espontânea de 1,2(2,3) para 1,3 diglicerídeos. Neste trabalho os autores concluíram que o micélio de *A. niger* contém uma lipase intracelular de especificidade similar à enzima extracelular de alguns fungos. A enzima produziu quantidade de glicerídeos após curto intervalo de tempo de hidrólise e máxima quantidade de ácidos graxos livres após longo intervalo de tempo, 30 minutos.

NAKASHIMA et alii 1988, 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 *Rhizopus chinensis* é específica para a posição 1,3 do triacilglicerol 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 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 glicose em grande concentração no meio de cultura reduziu a produção de lipase. Os compostos relacionados aos substratos foram utilizados como 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.

PARK, PASTORE e ALMEIDA 1988, reportaram a hidrólise de óleo de soja, óleo de milho e óleo de oliva por diferentes tipos de lipases, isoladamente e através de um sistema de lipases combinadas. Os resultados demonstraram que as lipases de *Rhizopus delemar*(D), *Penicillium sp*(G), *Rhizopus niveus*(N) hidrolisou 44, 42 e 7,2%, respectivamente. Porém um sistema de lipases combinadas G+N e G+D hidrolisaram óleo em até 98% após 10 horas de reação.

A lipase de *Rhizopus microporus* foi produzida e imobilizada por adsorção em DEAE-celulose e suas características estudadas por **DAVRANOV et alii** 1988. A lipase foi imobilizada em coluna de DEAE-Celulose à temperatura de 18°C sendo 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, cerca 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 consideraram que a imobilização levou a estabilização da enzima.

LANGRAND et alii 1990, investigaram a influência do tamanho da cadeia de álcoois e ácidos e da origem dos mesmos na síntese de ésteres, utilizando preparações comerciais de lipases de *Mucor miehei*, *Aspergillus sp.*, *Candida rugosa* e *Rhizopus arrhizus*.

Foram testados os ácidos acético, butírico, propiônico, valérico, capróico, e, os álcoois metanol, etanol, butanol, isopentanol, hexanol, citrionelol e geraniol. As modificações produzidas na síntese de éster variaram conforme as preparações de lipase e com a natureza dos ácidos e o álcool. A lipase de *Aspergillus sp.* foi altamente seletiva para ácidos e álcoois de cadeia curta. A lipase de *Candida rugosa* foi mais seletiva tanto para os ácidos butírico e propiônico quanto para o butanol, hexanol e pentanol. As lipases de *Mucor miehei* e *Rhizopus arrhizus* foram mais seletivas para ácidos de cadeia longa e não foram grandemente influenciadas quanto a natureza do álcool.

Os Autores concluíram que estas reações quando catalisadas por enzimas, são adequadas para síntese de ésteres, entretanto cada síntese tem sua especificidade adequada a cada tipo de lipase e condições experimentais.

ESPINOSA et alii 1990, realizaram experimentos sobre algumas condições nutricionais do meio de cultivo para produzir alto rendimento de lipase por *Rhizopus delemar*. Usando dextrina como fonte de carbono ao nível de 1%, extrato de levedura como melhor fonte de nitrogênio e uma fonte lipídica não maior que 2%, Tween 80 na faixa de 0,02 - 2,0%. Comparando diferentes fontes de carbono, os autores observaram que a dextrina produziu 1,6 vezes maior rendimento que a glicose.

Também utilizaram diferentes óleos como fonte de carbono e, encontraram que o óleo de girassol forma maior quantidade de enzima. Tween 80 pareceu ter duplo efeito, um como indutor devido a sua natureza química

semelhante à alguns substratos da enzima e, outro como surfactante. Sua presença estimulou a liberação da enzima aumentando a atividade lipolítica.

Concluíram com isto que a fonte de carbono e nitrogênio exercem importante efeito sobre a produção da enzima produzida por *Rhizopus delemar*.

PETROVIC et alii 1990, 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 de 30°C e pH ótimo 8,0. Os sais de potássio e sódio indicaram efeitos positivos na concentração de 1 mmol/l. Dos cátions bivalentes testados ocorreu ativação com íons Mn^{++} na concentração de 10 mmol/l e Ca^{++} 1 mmol/l, porém Mg^{++} diminuiu a atividade enzimática. O efeito mais negativo sobre a atividade foi encontrado na presença de sais de Fe^{+++} .

Em 1990 foi obtida uma grande produção de monoacilglicerol através da hidrólise enzimática de banha de boi, em trabalho realizado, por **McNEILL et alii**. Foram testadas as lipases comerciais de *Rhizopus japonicus*, *Mucor miehei* SP-398, *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida cylindracea*. A relação entre produção de monoacilglicerol e temperatura demonstrou que temperaturas superiores a 45°C aproximadamente 30% de monoacilglicerol foi obtido. A temperatura de 46°C ou mais baixa cerca de 70% de monoacilglicerol foi produzido. Após 3 horas a 46°C ou em temperatura mais baixa a mistura de reação tornou-se

sólida e a agitação ficou impossível. A composição da mistura de glicerídeos a 42 °C durante a hidrólise da banha demonstrou que inicialmente havia um decréscimo linear na concentração do triacilglicerol 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 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*. A lipase de *Mucor miehei* foi parcialmente efetiva, enquanto *Candida cylindracea* foi inativa.

IAGI et alii 1990, utilizando lipases de diferentes microrganismos, investigaram uma troca do grupo acila de fosfolípides. Sendo estes emulsificantes naturais com aplicações na Indústria de Alimentos, Cosméticos, Farmacêutica e outras. Suas propriedades dependem da composição em ácidos graxos e componente polar. A conversão enzimática é vantajosa com respeito a estereoquímica e especificidade posicional e as condições do meio de reação.

As lipases utilizadas foram de *Rhizopus delemar*, *Mucor javanicus*, *Candida cylindracea* e *Rhizopus sp.* A lipase de *Rhizopus delemar* catalisou a troca acila na reação entre vários fosfolípides a ácidos graxos. Quando incubada com 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) e ácido oléico com *Rhizopus delemar* o rendimento de diacilfosfatidil colina(PC) foi de 25% e a composição ácido graxo da PC convertida foi um conteúdo de ácido oléico de 25% e um conteúdo de ácido palmítico de 75%. Esta reação demonstrou especificidade na posição um do glicerol. As três lipases industriais de *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus* e *Candida cylindracea* tiveram

atividade na mudança do grupo acila da fosfatidilcolina, entre estas a de *Rhizopus sp.* foi a que teve melhor resultado.

Entretanto os autores sugeriram maiores investigações para elucidar melhor os mecanismos destas enzimas.

RIVERA-MUÑOZ et alii 1991, estudaram o crescimento de vários fungos em meio sólido, que produzissem alta atividade de lipase, pouca protease e fossem capazes de produzir aroma em produtos de laticíneos.

O meio sólido foi composto de farelo de trigo, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e soluções “traços” de elementos descrito por (CELERIM e FERGUS, 1971). Os fungos *Penicillium camemberti*, *Mucor miehei* e *Penicillium candidum* produziram as melhores atividades lipolíticas e pouca atividade de protease, demonstrando que a atividade proteolítica perturba a estabilidade da lipase.

YAMAGUCHI & MASE em 1991, purificaram e caracterizaram uma mono e diacilglicerol lipase isolada do fungo *Penicillium camemberti*. A enzima foi separada em duas forma ativas **A** e **B**, com pesos moleculares de 37000 e 39000 respectivamente, e composição aminoacídica e sequência N-terminal idênticas. A enzima **B**, principal componente, foi específica para monoacilglicerol de cadeia longa, e os triacilgliceróis mostraram-se inertes como substratos para a enzima. Esta enzima atacou a posição α melhor do que β no monoacilglicerol, mas não mostrou estereoespecificidade sobre mono e diacilglicerol.

Tanto Fe^{3+} quanto Hg^{2+} inibiram fortemente a atividade da enzima B, não sendo afetada significativamente pela adição de outros íons metálicos como K^+ , Na^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} , e também outros compostos como EDTA, p-cloromercúriobenzoato, N-etilmaleimida,

iodoacético e phenilmetilsulfonilfluoreto. Os autores encontraram também que outras lipases fúngicas foram inativadas por íons metálicos.

TAIPA et alii 1992, descreveram como sendo de grande importância as condições de produção de lipases microbianas, tendo o meio ambiente, temperatura de cultivo, pH, composição de nitrogênio, fonte de carbono, fonte de lípidos, concentração de sais inorgânicos e presença de oxigênio. Os Autores concluíram que a produção de lipase é estimulada por lípidos como por exemplo a manteiga, o óleo de oliva e ácidos graxos.

CHEN et alii 1992, realizaram a imobilização das lipases de *Candida cilindracea* e *Rhizopus arrhizus*, utilizando um pré-polímero que se polimeriza com foto sensibilizador. A enzima imobilizada foi usada para hidrolisar gordura de leite para liberar ácidos graxos de cadeia curta. A hidrólise ocorreu a 37°C por 15 horas.

A liberação de ácidos graxos de cadeia curta foi significativamente maior com a enzima imobilizada quando comparada a enzima livre. Foi observado também que a lipase de *C.cilindracea* obteve maior rendimento que a lipase de *R.arrhizus*. dando uma porcentagem molar aumentada de 5,9 vezes e 4,5 vezes repectivamente.

HAAS et alii 1992, purificaram e caracterizaram uma lipase extracelular de *Rhizopus delemar*. A enzima purificada tinha um monômero de peso molecular de 30000 e aproximadamente um monossacarídeo por molécula, a sequência de 28 resíduos N-terminal e um ponto isoelétrico 8,6. O pH de atividade da enzima pura ocorreu entre 8,0 e 8,5, e a enzima demonstrou 80% de atividade máxima entre 7,3 e 9,1, e com relação a termoestabilidade o máximo de atividade ocorreu a 30°C, tendo 80% de atividade entre 25 e 38°C. Acima de 45°C a atividade foi próxima de zero. A enzima foi instável acima de

30°C, e aproximadamente 50% da atividade permaneceu durante 15min. a 42°C. A inativação foi completa a 50°C por 5min.

Os Autores observaram que cátions bivalentes melhoraram a atividade da enzima, entre eles o cálcio, bário e magnésio. A lipase não foi inativada por agentes redutores como fluoreto de sódio e fenilmetilsulfonilfluoreto, sendo inativada por ácido *p*-cloromercuriobenzóico irreversivelmente.

MOJOVIC et alii 1993, fazendo uso de uma lipase de *Rhizopus delemar*, realizaram experimentos usando interesterificação de triacilgliceróis do óleo de dendê com ácido esteárico em *n*-hexano. Sob condições ótimas a troca do grupamento acila ocorreu principalmente entre o grupo palmitoil para o meio de fração do óleo de dendê e o grupo estearoil para a mistura de reação, dando um produto do qual a composição da acila na gordura foi semelhante àquela da manteiga de cacau.

Os autores observaram também que a adição de lecitina de soja aumentava a conversão do substrato, e isto foi atribuído a formação do sistema micelar reverso ao redor da celite imobilizada e a enzima hidratada. As micelas reversas protegem a enzima para o solvente não polar e aumentam a solubilidade e difusão do substrato e do produto. Os Autores concluíram também que o sistema celite-imobilizado pode ser utilizado para a modificação de óleos e gorduras, especialmente na indústria de alimentos.

LI et alii 1994, utilizaram lipase de *Mucor miehei* (IM-60) em um sistema com solvente orgânico, para sintetizar monoglicerídeo a partir do 1,2-isopropilideno glicerol e ácido graxo polinsaturado *n*-3. O sistema de reação teve a transesterificação catalisada pela lipase e foi obtido um rendimento de 83% de monoglicerídeos. Estes continham 76,2% de *n*-3 (eicosapentanóico)

43,3% e (docosahexanóico) 32,7%. Os solventes que apresentaram os melhores resultados foram isoctano e hexano.

KOHNO et alii 1994, realizaram estudos sobre as características de dois tipos de lipase de *Rhizopus niveus*. A lipase de *Rhizopus niveus* tem especificidade pela posição 1,3 do glicerol e é usada na produção de substitutos da manteiga de cacau. Foram encontradas duas lipases(lipase I e lipase II. A lipase I com duas cadeias polipeptídicas , sendo uma pequena com molécula de açúcar denominada de cadeia A e uma longo peptídeo de peso molecular de 34000 chamando cadeia B. A lipase II tem um peso molecular de 30000, consistindo em uma única cadeia polipeptídica.

Os Autores sugeriram que a lipase I demonstrou ser convertida em lipase II pela proteólise limitada por uma protease específica em pequena quantidade a qual está no sobrenadante do meio de cultivo. Esta sugestão foi baseada na formação dos pepetídeos que tinham a sequência N-terminal e C-terminal dos aminoácidos como a lipase II, bem como o peso molecular observado.

WATANABE et alii 1995, mostraram uma eficiência de imobilização de 85% para lipases de *Rhizopus niveus* e *Rhizopus sp*. A enzima foi imobilizada utilizando-se polietileno em pó. O material foi pré-lavado com etanol e dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 7.0. A enzima imobilizada foi adicionada a óleo de Perilla para hidrólise com objetivo de produzir ácido α -linolênico, pertencente a família dos n-3. O produto final da hidrólise foi determinado por HPLC sendo previamente extraído com éter de petróleo.Os autores concluíram que esta forma de imobilização produz uma efetiva hidrólise de óleo de Perilla.

XIA et alii 1996, estudaram a atividade e a estabilidade da lipase alcalina de *Penicillium cyclopium* variedade album (PG-37), em soluções surfactantes e soluções detergentes. Os Autores constataram que a atividade da lipase pode ser inibida quando se forma um complexo entre a superfície da lipase e a parte hidrofóbica do surfactante, sendo que o efeito inibidor foi dependente da concentração do surfactante.

Os Autores concluíram que a atividade da lipase pode ser melhorada pelo uso de detergentes sintéticos e que íons cálcio em soluções de sais neutros como NaCl e Na₂SO₄ estimulam a atividade da lipase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 Reagentes e Materiais Específicos

Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais, solventes, (MERCK, CARLO ERBA, RIEDEL ou equivalente).

Reagentes específicos: *p*-Nitrofenol (MERCK), *p*-Nitrofenil-Laurato (SIGMA), Albumina de soro bovina (BIOBRÁS).

Ácidos graxos: ácido láurico, ácido caprílico, ácido oléico (RIEDEL e SIGMA).

Glicerídeos: 1(3)- monoleína, 1.2(1.3) dioleína, trioleína, triacetina (SIGMA), gordura de côco (BRASIL), gordura de leite de cabra, óleo de oliva comercial.

Outros Reagentes: Triton X 100 (Isoctilfenilpolietileno), glicerina (REAGEN), phenilmethysulfonil fluoreto (SIGMA).

Meio de cultura: PDA (Potato Dextrose Ágar).

Meio de fermentação semi-sólido: farelo de trigo comercial e água destilada.

Resina: DEAE-SEPHADEX A-50 (Diethylaminoethyl Sephadex, Trocador Aniônico) (SIGMA).

Placas de vidro 24x24 cm, Sílica Gel G-60 (MERCK).

3.1.2. EQUIPAMENTOS.

-Estufas de cultura, mod. 002 CB, FANEN.

-Estufas bacteriológicas, FANEN.

-Autoclave vertical, PHOENIX.

-Banho termostático, GILSON.

- Banhos térmicos de temperatura controlada, FANEN.

-Potenciômetro , DIGIMED TE-902.

-Espectrofotômetro, BECKMAN DU-70.

-Coletor de frações mod. Fractomete^(R) Alpha 200, BUCHLER.

-Centrífuga refrigerada mod. J2-21, BECKMAN.

-Agitador de tubos mod. AT-56, PHOENIX.

-Balança semi-analítica OHAUS^(R) Precision plus, TECNAL.

-Balança analítica mod. H-10, METTLER.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. PRODUÇÃO DA ENZIMA.

3.2.1.1. Preparo do Inóculo.

Para produção da enzima foi utilizada cultura de *Rhizopus sp* (linhagem pré-selecionada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos), cultivada em meio de PDA. Foi preparada uma suspensão de esporos, adicionando-se 10 ml de água destilada estéril em cada tubo contendo a cultura selecionada, a superfície do tubo foi raspada com alça de níquel - cromo para retirada dos esporos. Esta suspensão foi colocada em Erlenmeyer do qual foi retirado 1 ml e inoculado em cada Erlenmeyer de 500ml.

3.2.1.2. Fermentação Semi-sólida.

Foi preparado meio de fermentação semi-sólida constituído de farelo de trigo e água na proporção de 60 e 40 (p/v) e colocados em Erlenmeyer de 500ml. Este meio foi esterilizado em autoclave por 15 min. A 120°C. O meio foi adicionado de 1 ml do inóculo descrito no item acima e incubados a 30°C por 120 horas em estufa termostaticada para a produção das enzima.

3.2.1.3. Extração da Enzima.

Após o período de incubação os frascos Erlenmeyer foram retirados da estufa, adicionados 100 ml de água destilada, e em seguida,

deixados em repouso por cerca de 30 min. Depois desse tempo o meio foi homogeneizado com bastão de vidro e o conteúdo foi filtrado em lã de vidro para obtenção do extrato aquoso contendo a enzima bruta.

3.2.2.FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO.

Ao extrato aquoso obtido foi adicionado sulfato de amônio até 70% de saturação. Esta adição foi realizada em banho de gelo para manutenção da atividade da enzima. A mistura permaneceu sob refrigeração por 24 horas. Após este período a mistura foi centrifugada a 7000 rpm / 4°C por 15 min. O precipitado contendo a enzima bruta foi dialisado contra água deionizada em membrana de acetato de celulose a temperatura de 10°C por 48 horas. Posteriormente a enzima bruta foi liofilizada e mantida em freezer.

3.2.3. Determinação da Atividade Lipolítica da Enzima Bruta.

3.2.3.1. Determinação da Atividade Enzimática nos Substratos Óleo de Oliva, Gordura de Côco, Gordura do Leite de Cabra e Óleo de Mamona.

A atividade de hidrólise foi determinada em um sistema de reação composto de 1 grama dos diferentes substratos, 4 ml de tampão fosfato de sódio pH 6.0 na concentração 0.05M, 1 ml do extrato bruto enzimático na concentração de 10mg/ml e 10 pérolas de vidro de 0,3mm de diâmetro cada mantidos em Erlenmeyer. A mistura foi incubada em banho termostatizado à 40°C por 60 min. com 130 oscilações por min . A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de Etanol/Acetona (1:1, v/v) e a atividade foi medida por titulação dos ácidos graxos livres com uma solução de KOH 0,05N e indicador fenolftaleína. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1µmol de ácido graxo por minuto nas condições do ensaio.

O cálculo da atividade enzimática nos substratos óleo de oliva e óleo de mamona foi realizado utilizando-se uma curva padrão de ácido oléico x ml de KOH 0,05N. O mesmo cálculo foi realizado para os substratos gordura de côco e gordura do leite de cabra, sendo utilizada uma curva padrão de ácido láurico e outra de ácido caprílico para os respectivos substratos.

3.2.3.2. Determinação da Atividade Enzimática em Substrato *p*-Nitrofenil-Laurato (PNPL).

3.2.3.2.1. Preparação do Substrato PNPL.

O substrato foi preparado dissolvendo-se 161 mg de *p*-nitrofenil-laurato em 190 ml de tampão acetato pH 5,6 na concentração de 0,05 M

contendo 2,1% de Triton X-100 para o volume de tampão. A mistura foi homogeneizada a 70°C até a total solubilidade do PNPL.

3.2.3.2.2. Preparo do Sistema de Reação com Substrato PNPL.

O sistema de reação foi realizado com 0,95 ml da mistura mencionada no item anterior, e pré-incubados a 37°C por 5 min, após este período foi adicionado 50µl da enzima na concentração de 2mg/ml e o sistema permaneceu sob a temperatura de 37°C por 15 min. Após este tempo a reação foi paralisada pela adição de 2 ml de acetona. O branco foi adicionado da enzima somente após a paralização da reação.

A cor amarela produzida pela liberação do p-nitrofenol foi quantificada pela medida da absorbância da mistura de reação a 410 nm.

Uma unidade de atividade da lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera p-nitrofenol expresso em µmol de paranitrofenol por minuto, por ml de enzima. O cálculo da atividade enzimática foi realizado utilizando-se uma curva padrão de p-nitrofenol µmoles x absorbância a 410 nm.

3.2.3.3. Determinação do Número de Saponificação.

Para a determinação do número de saponificação de cada substrato, foram misturados em balões de fundo chato de 250ml, 1 grama de gordura de côco, gordura do leite de cabra e de óleo de oliva alternadamente, 25ml de KOH alcoólico 1N e 4ml de tampão acetato pH 5,6 na concentração de 0,05M.

A mistura da reação foi aquecida à temperatura de ebulição por 40 minutos e após este período a solução de KOH remanescente foi titulada

contra uma solução de HCl 1N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Foi preparado um branco para cada mistura, isento de substrato. O número de saponificação (Ns) é dado como: a quantidade de álcali necessário para saponificar uma quantidade de amostra conhecida, o valor é expresso como número de miligramas de KOH requerido para saponificar um grama de amostra.

$$Ns = (B-A) \times N. HCl \times 56,1 / P$$

B = ml de HCl usados na titulação do branco

A = ml de HCl usados na titulação da amostra

N HCl = normalidade do HCl

P = peso da amostra em gramas

3.2.4. Caracterização Bioquímica da Lipase Bruta no Substrato Óleo de Oliva.

3.2.4.1. Efeito do pH na atividade da enzima.

O efeito do pH na atividade enzimática foi realizado utilizando-se um sistema de reação composto de 1 grama de óleo de oliva, 4ml dos diferentes tampões na concentração de 0,1M e, 1ml do extrato bruto enzimático na concentração de 10mg/ml, 10 pérolas de vidro de 0,3mm de diâmetro colocados em frascos Erlenmeyer.

Foram preparadas as seguintes soluções tampão: Tampão acetato pH 3.6, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.6. Tampão fosfato pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 e 8.0, tampão tris-HCl pH 8.0, 8.5 e 9.0.

A mistura foi incubada em banho termostatizado à 40C por 60 min. Com 130 oscilações por min. A reação foi paralisada pela adição de 15ml

de etanol/acetona (1:1, v/v), e a atividade foi medida por titulação dos ácidos graxos livres com uma solução de KOH na concentração de 0,05N e indicador fenolftaleína. A atividade foi medida conforme descrito no item 3.2.3.1

3.2.4.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima.

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi realizado tratando-se uma solução de lipase na concentração de 10mg/ml com 2ml dos diferentes tampões na concentração de 0,1M.

Foram utilizadas as seguintes soluções tampão: Tampão acetato pH 3,6- 4,0- 4,5- 5,0- 5,6. Tampão fosfato pH 6,0- 6,5- 7,0- 7,5- 8,0. Tampão Tris-HCl pH 8,0- 8,5- 9,0. A mistura foi deixada por 24 horas a temperatura de 25°C. Após este período, foi retirado 1ml da mistura e colocado em um sistema de reação composto 1 grama de óleo de oliva, 4ml de água destilada, 10 pérolas de vidro com 0,3 ml de diâmetro.

O sistema de reação foi incubado por 60 min. a 40°C em banho termostatizado com 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 15ml de etanol/acetona (1:1; v/v). A atividade foi medida conforme o item 3.2.3.1.

3.2.4.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima.

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi realizado utilizando-se um sistema de reação constituído de 4ml de tampão fosfato pH 6,0 na concentração de 0,05M, 1 grama de óleo de oliva, 1ml do extrato enzimático bruto na concentração 10mg/ml, 10 pérolas de vidro com 0,3mm de

diâmetro. A mistura foi incubada nas temperaturas de 25°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 70°C por 60 minutos em banho termostatzado, e a reação foi paralisada pela adição de 15ml de etanol/acetona (1:1, v/v). A atividade foi medida de acorde com o ítem 3.2.3.1.

3.2.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi realizado utilizando-se 2ml de uma solução de enzima na concentração 10mg/ml diluída em tampão fosfato de sódio pH 6,0 a 0,05M, colocada em tubos de ensaio e pré-incubada nas temperaturas de 25°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 70°C por 60 minutos. Após este período foi retirado 1ml da solução enzimática e adicionada a frascos Erlenmeyer contendo um sistema de reação composto de 4ml tampão fosfato, 1 grama de óleo de oliva, 10 pérolas de vidro com 0,3mm de diâmetro e incubados a 40°C em banho termostatzado por 60 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15ml de Etanol/Acetona (1:1, v/v). A atividade foi medida de acordo com o ítem 3.2.3.1.

3.2.4.5. Efeito da Interferência de Íons na Atividade da Enzima.

Foram preparados sistemas de reação constituídos de 4ml de tampão fosfato de sódio pH 6,0 na concentração de 0,05 M., 1 grama de óleo de oliva, 10 mg do extrato enzimático bruto e 10 pérolas de vidro 0,3mm de diâmetro e foram adicionados de 1mM e 10mM de CaCl₂ e MgSO₄, colocados em frascos Erlenmeyer de 125 ml. A mistura de reação foi incubada a 40°C por 60 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 15ml etanol / acetona na concentração 1/1 (v/v).

A atividade foi medida conforme o descrito no ítem 3.2.3.1.

3.2.5. Purificação da enzima.

Foram dissolvidos 3,5g de enzima bruta liofilizada em 45 ml de tampão fosfato pH6.0 na concentração de 0,05M, com atividade hidrolítica de lipase sobre os substratos óleo de oliva e *p*- nitrofenil-laurato. Esta solução foi filtrada em Celite previamente tratada com HCl para retirada de esporos remanescentes e lavada com água destilada até pH 5,5. O filtrado foi purificado utilizando-se cromatografia em coluna com DEAE-SEPHADEX A-50.

3.2.5.1. Cromatografia em coluna de DEAE-SEPHADEX A-50.

A solução de enzima preparada como anteriormente descrito, foi purificado através de cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-SEPHADEX A-50.

A resina foi previamente tratada com solução de NaOH 1N e HCl 1N, sendo que em cada etapa a resina foi lavada com água destilada para remoção dos reagentes e no final acondicionada com solução tampão fosfato de sódio 0,01M pH6.0 até sua estabilização. A resina foi então colocada em coluna de vidro de 2,5cm x53cm. A solução de enzima foi aplicada no topo da coluna com um volume total 58ml. As proteínas presentes foram eluídas pela adição de um gradiente de NaCl contínuo nas concentrações de 0,1 a 0,7 M.

As frações eluídas e coletadas em coletor automático BUCHLER Fractomette^(R) Alpha 200 e monitoradas por espectrofotometria a 280nm (UV) foram submetidas a determinação de atividade conforme o descrito nos itens 3.2.3.1 e 3.2.3.2.

As frações coletadas foram concentradas em membrana de 10.000 Daltons sob refrigeração.

3.2.5.2. Dosagem de proteína pelo método de Lowry.

Para determinar a concentração de proteína nas soluções enzimáticas bruta e parcialmente purificada foi utilizado o método de Lowry et alii (1951), tendo como padrão Albumina de Soro Bovino.

3.2.6. Caracterização Bioquímica da lipase bruta e parcialmente purificada em substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato (PNPL).

3.2.6.1. Efeito do pH na atividade da enzima.

Foram preparados tampões de acordo com o descrito no item 3.2.4.1., e a atividade foi medida seguindo o mesmo descrito no item 3.2.3.2. Foram submetidas a este teste de atividade as frações I e II e a enzima bruta.

3.2.6.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima.

Para este estudo foram tomados 1,0 ml das frações I e II e da enzima bruta aos quais foram adicionados 2,0 ml dos diferentes tampões preparados conforme o item 3.2.4.1.

Permaneceram por 24 horas à temperatura de 25°C, em seguida foram submetidas ao teste de atividade e mensuradas conforme o descrito no item 3.2.3.2.

3.2.6.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima.

Para verificar o efeito da temperatura na atividade enzimática das Frações I e II e lipase bruta, foram utilizadas as temperaturas de 25°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 70°C, e a atividade foi medida de acordo com o item 3.2.3.2.

3.2.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi verificado colocando o sistema de reação descrito em 3.2.3.5. adicionados da enzima foram tampados e incubados as diferentes temperaturas descritas em 3.2.4.3, por um período de 60 minutos. Após este tempo atividade lipolítica foi determinada como o descrito no item 3.2.3.2.

3.2.6.5. Efeito da concentração de substrato sintético PNPL na atividade enzimática.

Para verificar a interferência das diferentes concentrações de substrato na atividade enzimática, foram preparadas concentrações de PNPL de 0,05, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 e 10 mM dissolvidos em tampão acetato pH5,6 0,05M. Em cada tubo contendo 0,95ml do substrato das diferentes

concentrações foram colocados 100µl das frações I e II e o sistema seguiu conforme o descrito no item 3.2.3.4.

Para este estudo a Constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas segundo o sistema gráfico de LINEWEAVER & BURK em 1934.

3.2.7. Determinação da porcentagem de hidrólise utilizando-se os substratos óleo de oliva e gordura de côco em relação ao tempo de reação.

Para verificar o potencial de hidrólise da lipase de *Rhizopus sp.* na modificação de óleos e gorduras foram estudados sistemas de reação contendo os substratos óleo de oliva e gordura de côco. Os substratos na quantidade de 1g foram misturados a 4ml de tampão fosfato pH6, na concentração de 0,05M. A enzima bruta foi adicionada na concentração de 10 mg/ml e a mistura foi incubada a 40°C por períodos variáveis de zero hora, 24, 48, 96, 120, 168, 192, 216, 240 horas e as amostras foram coletadas nos intervalos de tempo. Adicionou-se ao sistema de reação após estes períodos 15ml etanol/acetona 1:1 (v/v), e os ácidos graxos liberados foram titulados contra KOH 0,05N e utilizando-se como indicador fenolftaleína.

A porcentagem de hidrólise foi calculada tendo como base a concentração de ácidos graxos livres e o número de saponificação da cada substrato, como descrito no item 3.2.3.3.

3.2.8. Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos Produtos de Hidrólise da Lipase Bruta e Parcialmente Purificada (Fração I e Fração II), de *Rhizopus sp.*

A Cromatografia em Camada Delgada foi realizada preparando-se uma mistura de 45 gramas de Sílica Gel G-60 com 90 ml de ácido bórico 0,3M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20x20cm de dimensão, com 2mm de espessura, com aplicador DESAGA* e colocada para ativação em estufa a 100°C por 40 minutos.

Foi utilizado um sistema solvente constituído de éter etílico, éter de petróleo e ácido fórmico 210:90:0,4 (v/v), respectivamente.

O cromatograma desenvolveu-se em aproximadamente 40 minutos a temperatura de 25°C. A revelação foi feita através da exposição da placa em câmara de iodo sublimado a qual foi incubada a temperatura de 110°C por 60 minutos.

Foram utilizados como padrões trioleína, 1,3-dioleína, 1-monoleína (SIGMA) na concentração de 1% em solução etanol/acetona 1:1 (v/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção da lipase em meio semi-sólido

Para a produção de lipase pela linhagem de *Rhizopus sp.*, foi utilizado o processo de fermentação semi-sólida, utilizando-se como meio de cultivo um subproduto da indústria de panificação (farelo de trigo) e água, sendo este um processo de baixo custo para produção de enzima fúngica, e de grande rendimento sendo obtido 1 grama de extrato enzimático bruto para cada 72 gramas de farelo nas condições descritas nos itens 3.2.1.1 e 3.2.1.2. O extrato bruto foi facilmente obtido pela maceração do meio de fermentação com água deionizada e filtração simples. Ao volume aquoso obtido foi adicionado de sulfato de amônio a 70% de saturação, para precipitação das proteínas presentes.

FUKUMOTO et alii (1963), selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* que produziu 21 gramas de enzima bruta para cada 53 gramas de farelo de trigo em um período de incubação de 72 horas a 30°C. Estes autores utilizaram CaCO_3 no meio de fermentação.

Um outro meio foi testado por ESPINOSA et alii (1990), melhorando os efeitos nutricionais pela adição de 1% de dextrina como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio para produção de lipase de *Rhizopus delemar* com uma produção de 16,5 gramas de extrato enzimático bruto por ml de meio, em um período de 96 horas a 29°C.

4.1.1 Purificação da enzima em coluna de DEAE-Sephadex

A purificação da enzima foi realizada de acordo com o item 3.2.5.1.

O fluxograma da produção e purificação da lipase está descrito na figura 1.

A lipase de *Rhizopus sp* foi obtida por fermentação semi-sólida, fracionada com sulfato de amônio e posterior centrifugação. A purificação por cromatografia em DEAE Sephadex A-50 está sumarizada na figura 2.

A enzima foi purificada 2,06 vezes após fracionamento com sulfato de amônio. Na cromatografia em Coluna de DEAE Sephadex A-50 foram encontradas duas frações com atividade lipolítica denominadas fração I e fração II pelo gradiente de NaCl em que foram eluídas.

A fração I foi eluída com 0,2 M e a fração II com 0,3 M de NaCl. Sendo a fração I purificada 5,14 vezes, enquanto que a fração II foi purificada 1,9 vezes. A atividade específica (unidades/ mg proteína), foram 257 e 95 unidades para fração I e II respectivamente.

IWAI et alii (1974), purificaram três tipos de lipase de *Rhizopus delemar* e observaram suas características quanto ao pH e temperatura. As lipases A e C tratadas com sulfato de amônio e filtradas em celite posteriormente aplicadas em coluna de SEPHADEX G-25 eluídas com gradiente linear de NaCl. O mesmo tratamento foi realizado com a lipase B, exceto a coluna que nesta usou-se SEPHADEX G-200. Foram obtidas 2333, 4000 e 11666 unidades de atividade específica para as lipases A, B e C respectivamente, com uma porcentagem de recuperação para a lipase A de 2%, lipase B 4,3% e a lipase C 12%.

HOOVER et alii 1973, purificaram a lipase de *Aspergillus flavus* por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia, utilizando DEAE-

Celulose e Sephadex G-200. A enzima foi purificada 109 vezes e teve 17,5 unidades de atividade específica.

ISHIHARA et alii 1975, purificaram a lipase de *Mucor javanicus*, utilizando uma coluna de Sephadex G-200 e outra G-75. A enzima foi recuperada em 2,4% e teve uma atividade específica de 1322 unidades.

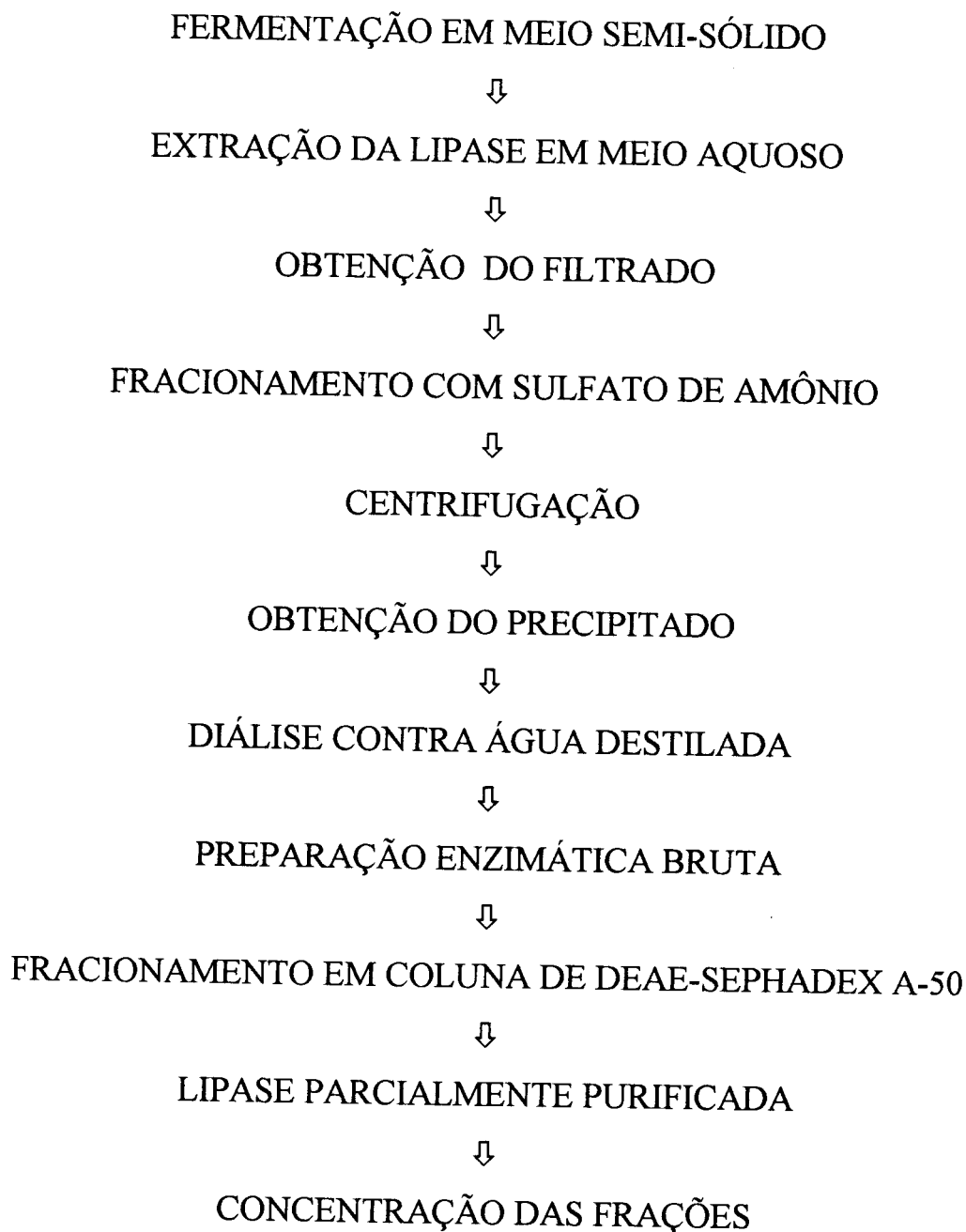


Figura 1 - Fluxograma da produção e purificação parcial da lipase de *Rhizopus sp.*

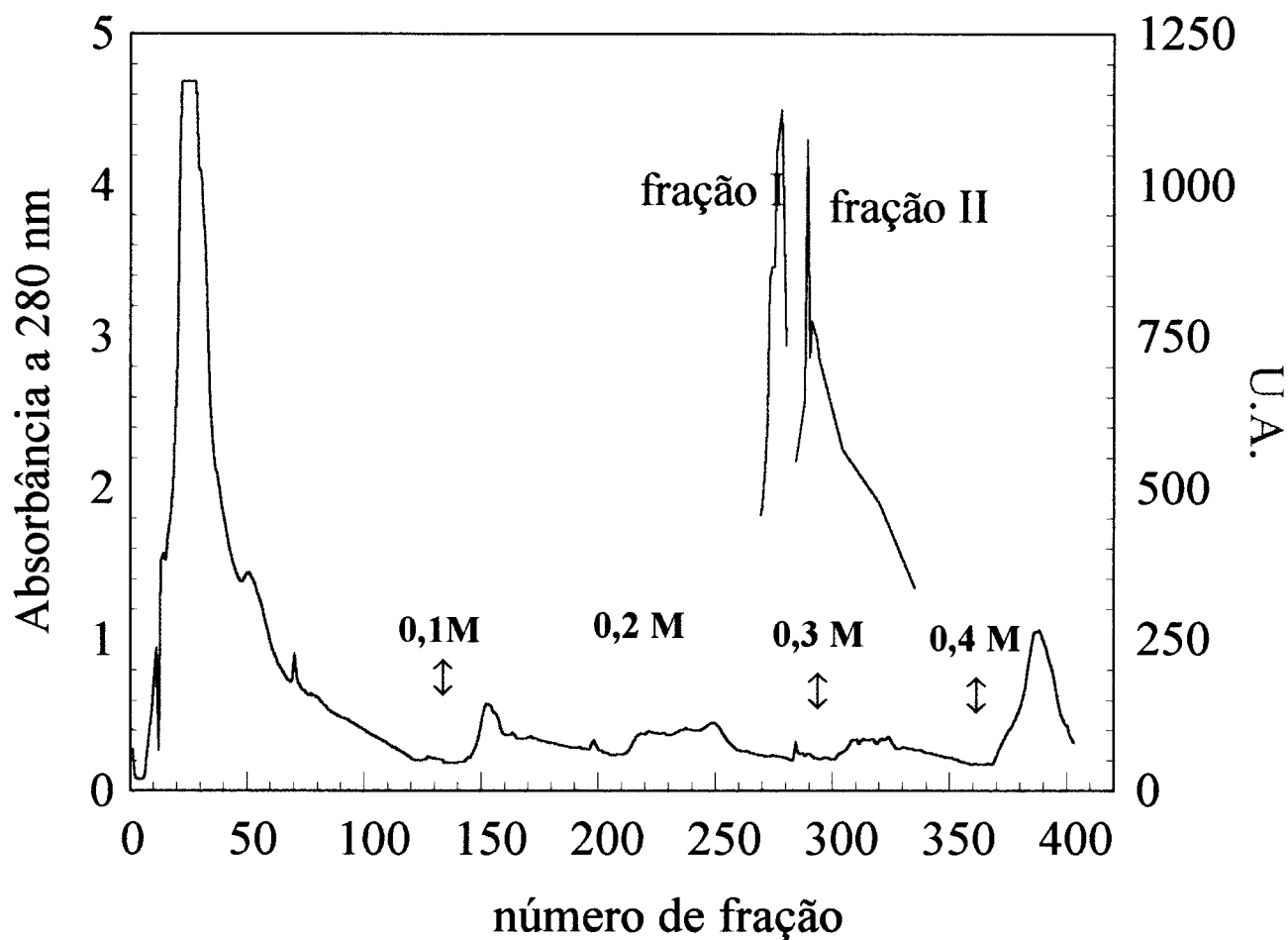


Figura 2 - Cromatografia da lipase de *Rhizopus* sp em coluna DEAE-Sephadex A-50.

U.A. = Unidade de Atividade (μ moles de *p*- nitrofenol / min / ml de enzima)

Tabela 1- Purificação parcial da lipase de *Rhizopus sp.* linhagem 14.

Etapa	Vol. (ml)	Unidades (μmoles <i>p</i>- <i>nitrofenol</i>/ min/ml)	Atividade total (Unidades)	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (Unidade/mg proteína)	Purificação (%)	Recuperação (%)
Sobrenadante do meio de cultura	5170	1157	5981690	23,13	50	1	100
Fracionamento com sulfato de amônio	48	2825	135600	27,42	103	2,06	2,26
Cromatografia em coluna de DEAE- Sephadex A-50 Fração I	50	41,13	2056,5	0,16	257	5,14	0,034
Cromatografia em coluna de DEAE- Sephadex A-50 Fração II	50	53,13	2656,5	0,56	95	1,9	0,044

4.2 Determinação da atividade lipolítica em óleo de oliva, gordura de côco, gordura de leite de cabra.

A Figura 3 demonstra claramente uma maior a atividade da lipase sobre o substrato gordura de côco, comparado ao óleo de oliva e gordura de leite de cabra. A atividade relativa indicou um percentual em torno de 95% de hidrólise para gordura de côco em 1 hora de reação.

O sistema de hidrólise e a quantificação do percentual foi determinado de acordo com os itens 3.2.3.1. É descrito na literatura que lipases de diferentes origens podem hidrolisar substratos de diferentes número de carbono e grau de saturação dos respectivos ácidos graxos, o que esclarece a estereoespecificidade das lipases.

HOOVER et alii (1973), isolaram uma linhagem de *Aspergillus flavus* que hidrolisou os triglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia curta do que os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa. Estes autores observaram que o Km para trilaurina (C: 12) e trimiristina foram $9,09 \times 10^{-4}$ $1,42 \times 10^{-3}$ M, respectivamente.

AKHTAR et alii (1980), estudaram uma lipase produzida por *Mucor hiemalis* e observaram que a produção de lipase foi aumentada quando o meio foi adicionado de óleo de oliva. A lipase produzida foi mais efetiva contra óleo de côco do que contra óleo de mostarda ou óleo de oliva. O fato do substrato estar ou não emulsificado, não interferiu na especificidade.

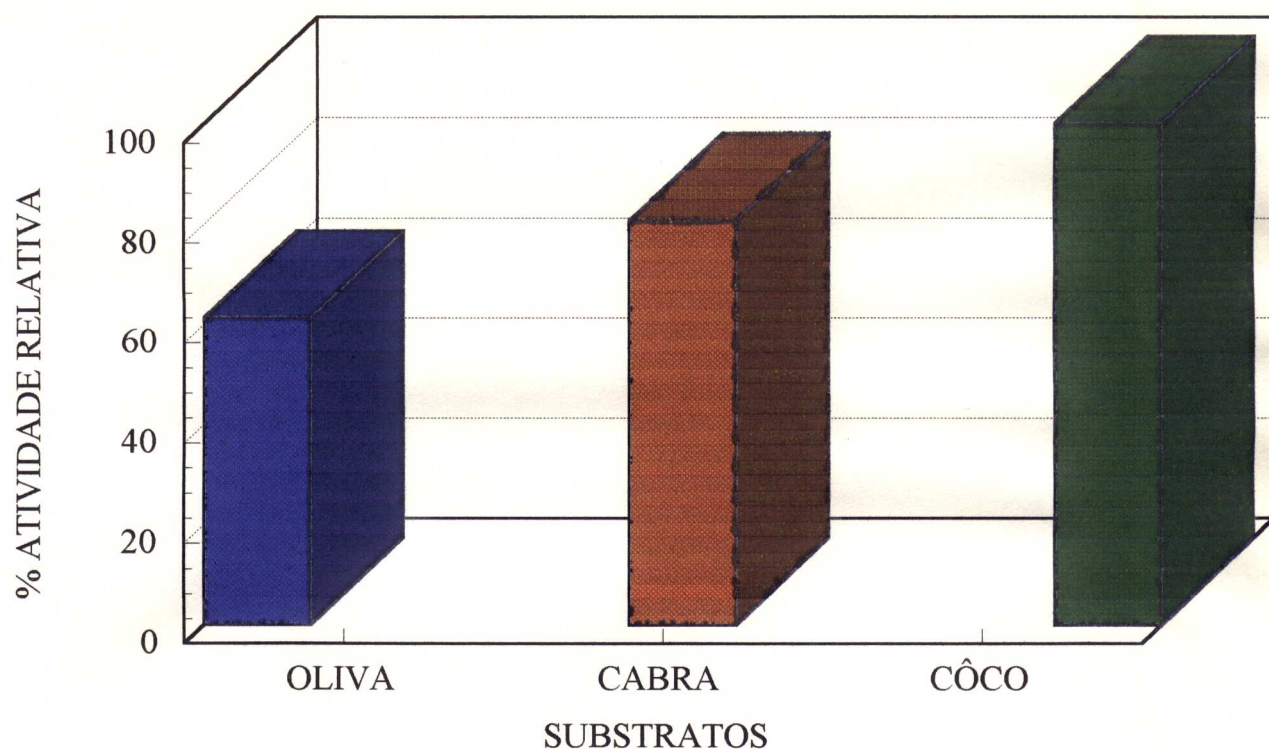


Figura 3 - Ação hidrolítica da lipase de *Rhizopus sp* sobre diferentes substratos

4.3 Caracterização bioquímica da lipase bruta em substrato óleo de oliva.

4.3.1 Efeito do pH na atividade da enzima.

O efeito do pH na atividade da enzima foi estudado de acordo com o item 3.2.4.1 e demonstrado na Figura 4 que a enzima teve melhor atividade em pH na faixa de 6,0-6,5 em tampão fosfato de sódio a 0,05M.

ISHIHARA et alii (1975), encontraram pH 7,5 como sendo o melhor para a atividade da lipase de *Mucor javanicus*.

IWAI & TSUJISAKA (1974), ao estudarem as propriedades de três lipases de *Rhizopus delemar* e encontraram como pHs ótimos de atividade 5,6 para a lipase A 5,5 para as lipases B e C.

AKTHAR (1980), encontrou o pH 7,0 como sendo o ótimo de atividade para lipase de *Mucor hiemalis*.

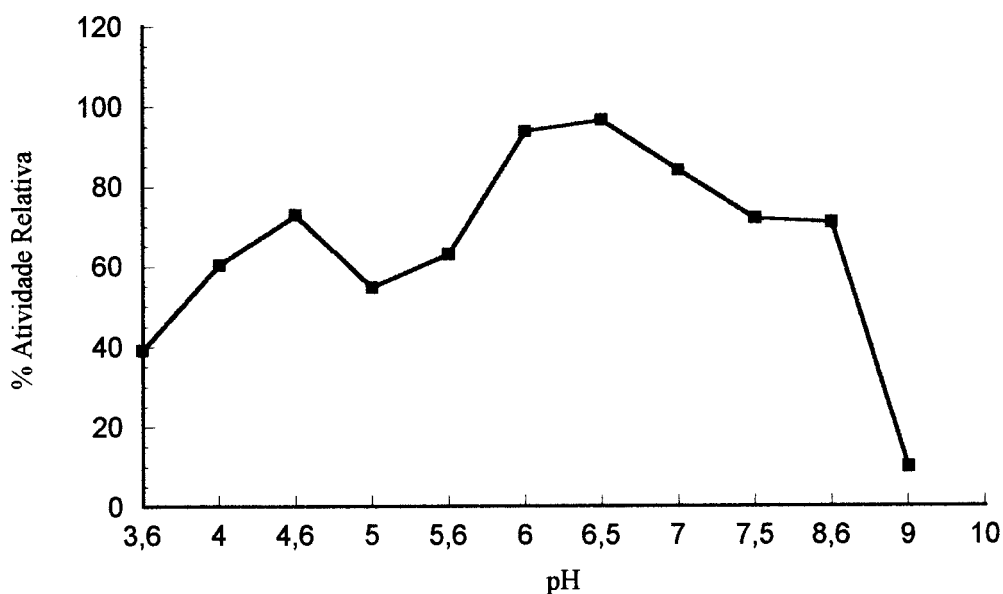


Figura 4 - Efeito do pH na atividade da lipase de *Rhizopus sp* em substrato óleo de oliva.

4.3.2 Efeito do pH na estabilidade da enzima.

O efeito do pH na estabilidade da enzima foi estudado conforme descrito em 3.2.4.2, e foi encontrado a faixa de pH entre 6,0-7,0 a lipase foi mais estável, mantendo 95% de atividade. Este resultado pode ser facilmente verificado na Figura 5.

IWAI & TSUJISAKA (1974), purificaram e caracterizaram três lipases de *Rhizopus delemar*. Foi verificado que a lipase A foi mais estável em pH entre 3,0-8,0 enquanto que as lipases B e C foram estáveis em torno de 4,0 a 7,0.

SUGIHARA et alii (1988), purificaram e caracterizaram a lipase de *Aspergillus niger* e encontraram o pH de estabilidade na faixa de 3,0 a 10,5 a 30°C.

ISHIHARA et alii (1975), verificaram que a lipase de *Mucor javanicus* permaneceu estável na faixa de pH entre 4,5 a 8,0, entretanto mostrou-se instável a pH abaixo de 4,0 após 4 horas de incubação à temperatura ambiente.

Comparando os resultados obtidos com a lipase de *Rhizopus sp*, observamos que a faixa de pH de estabilidade é muito estreita, frente as lipases já relatadas.

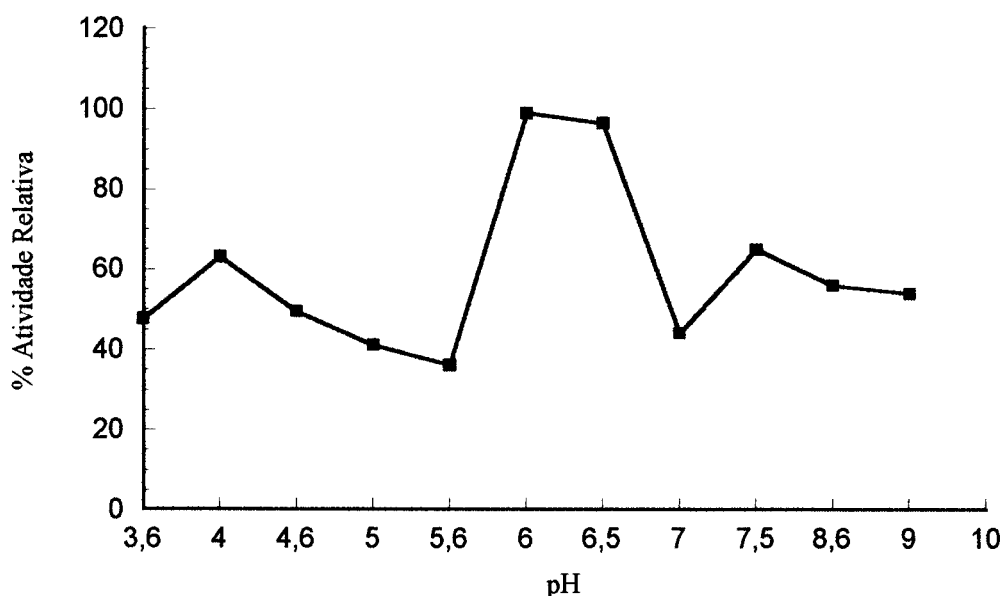


Figura 5 - Efeito do pH na estabilidade da lipase de *Rhizopus sp.* em substrato óleo de oliva.

4.3.3- Efeito da temperatura na atividade da enzima

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi realizado de acordo com item 3.2.4.3. Pode ser observado na Figura 6, que a melhor atividade ocorreu aos 40°C e a 55°C tendo uma rápida diminuição aos 70°C. Após incubação a 55°C, ocorreu uma rápida diminuição da atividade enzimática.

SUGIHARA et alii (1988), relataram a temperatura ótima de atividade 30°C para a lipase de *Aspergillus niger*.

Ao estudar dois tipos de lipase de *Rhizopus niveus* KOHNO et alii (1994), encontraram temperatura ótima de atividade para lipase I de 35°C e para lipase II 40°C, sendo que a lipase apresentou de 80% a 100% de atividade entre 28°C e 38°C enquanto que a lipase II apresentou esta atividade entre 23°C - 43°C.

HAAS et alii (1992), encontraram uma atividade de 80% entre 25°C e 38°C para a lipase de *Rhizopus delemar*, ocorrendo o máximo de atividade aos 30°C. Não houve atividade em temperaturas acima de 45°C nos dois primeiros minutos de incubação.

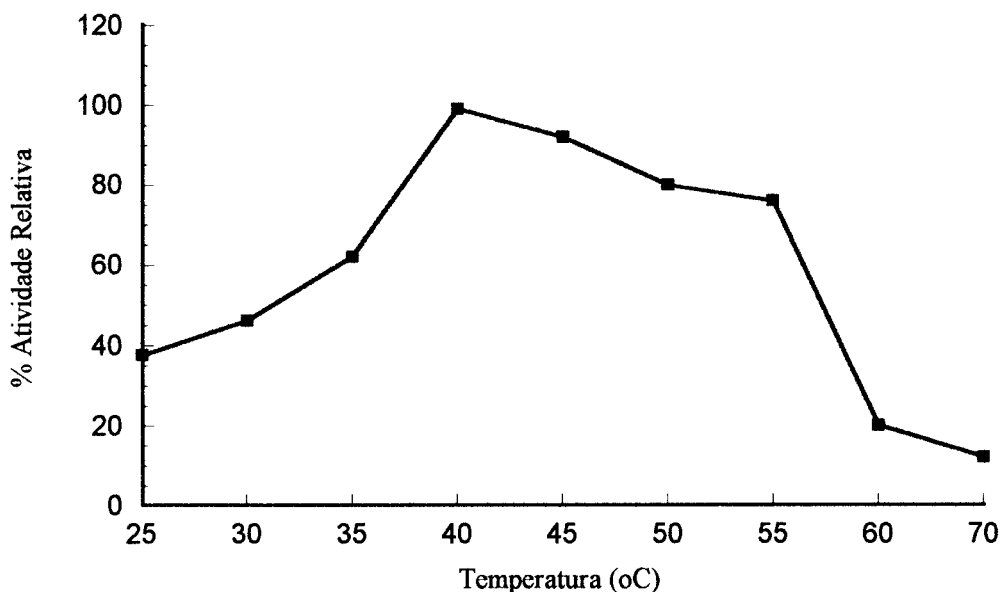


Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Rhizopus sp.* em substrato óleo de oliva.

4.3.4 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

A estabilidade térmica da enzima foi estudada de acordo com o mencionado em 3.2.4.4, sendo possível visualizar que a temperatura de estabilidade foi na faixa de 25°C a 40°C onde a enzima manteve 100% e 90% de atividade respectivamente após o tratamento térmico. A Figura 7 demonstra os dados obtidos.

HAAS et alii (1992), realizaram estudos com uma lipase extracelular de *Rhizopus delemar* e constataram instabilidade da enzima acima de 30°C, e que aproximadamente 50% de atividade foi perdida durante aquecimento por 15 min. a 42°C. Acima de 50°C a enzima foi completamente inativada.

As lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* apresentaram estabilidade térmica a 50°C, 65°C, 45-50°C e 40°C respectivamente por 15min, em pH 5,6 em estudos realizados por TSUJISAKA et alii (1972).

IWAI et alii (1975), encontraram como sendo 30°C a termoestabilidade de duas enzimas de *Penicillium cyclopium* a pH 6,0 por 15 minutos.

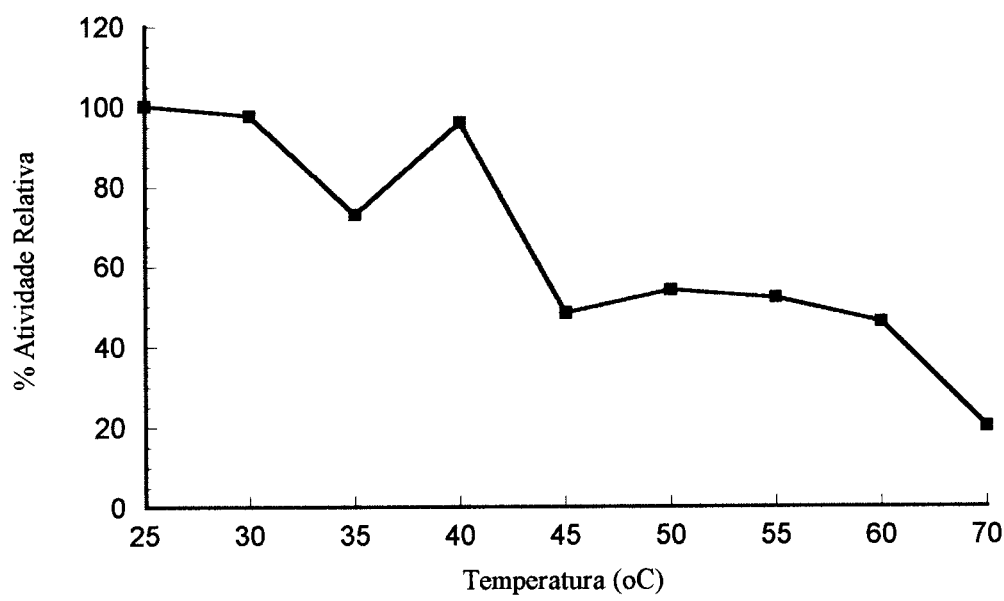


Figura 7 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase de *Rhizopus sp.* em substrato óleo de oliva.

4.3.5 Estudo da interferência de íons na atividade da enzima.

Este estudo foi realizado conforme o descrito no item 3.2.4.5. Os resultados podem ser observados na Figura 8, onde se constata claramente que o íon Ca^{++} melhora significativamente a atividade da enzima na concentração de 10mM.

Ao purificar e caracterizar uma mono e diacilglicerol lipase de *Penicillium camembertii*, YAMAGUSHI & MASE (1991), testaram os efeitos de diferentes compostos na atividade lipolítica e observaram que a atividade enzimática foi fortemente inibida em 87% e 92% pelos respectivos íons Fe^{+++} e Hg^{++} .

Outros íons foram testados como K^+ , Na^+ , Ba^{++} , Ca^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} e Zn^{++} não afetaram significativamente a enzima.

HAAS et alii (1992), constataram que íons divalentes como cálcio, bário e magnésio melhoram a atividade na concentração de 10mM, e a ativação máxima foi dada pelo cálcio a 10mM. E também observaram que a lipase não foi inativada por agentes redutores como fluoreto de sódio ou fenilmetilsulfonilfluoreto, entretanto foi inativada irreversivelmente por ácido *p*-cloromercuriobenzóico.

SUZUKI et alii (1986), usaram lipase de *Rhizopus japonicus* NR-400 e observaram que a atividade não foi afetada pela adição de 1mM de íons metálicos ou sais biliares.

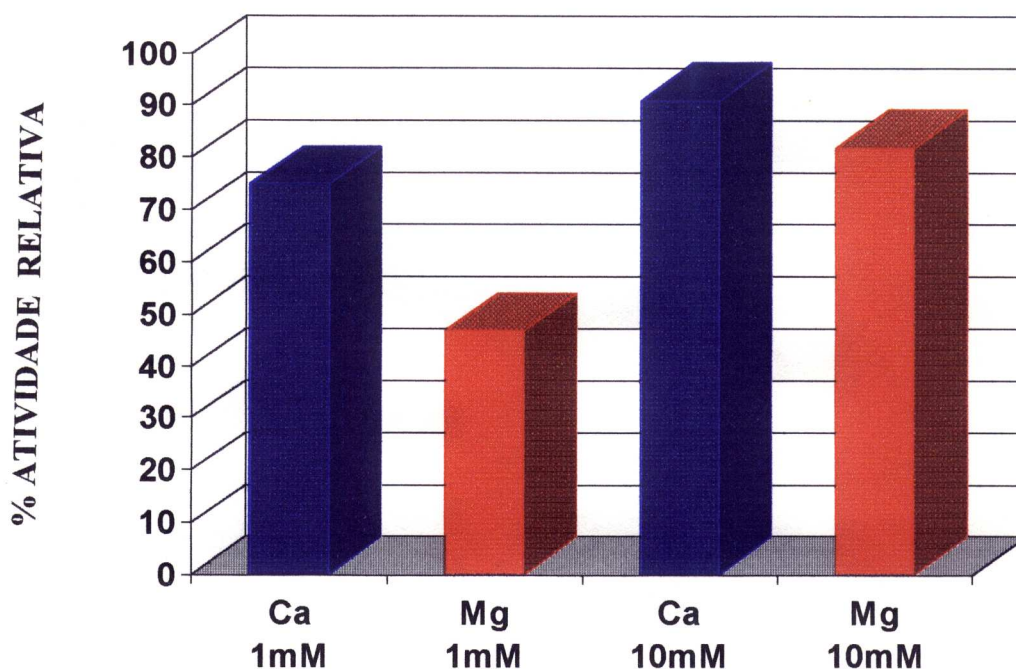


Figura 8.-Efeito da interferência de íons cálcio e magnésio na atividade da lipase de *Rhizopus sp.* sobre óleo de oliva.

4.4 Caracterização bioquímica da lipase bruta e parcialmente purificada utilizando-se como substrato PNPL.

4.4.1 Efeito do pH na atividade da enzima

As frações obtidas na cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50, bem como a lipase bruta foram analisadas quanto ao efeito do pH ótimo na atividade utilizando-se substrato sintético PNPL, e foi determinado como descrito no item 3.2.6.1. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 9, confirmando que a lipase bruta e a fração **II** tiveram melhor percentual de atividade em pH próximo de 6,5, enquanto que a fração **I** teve seu pH ótimo próximo de 7,5. Portanto os perfis de atividade são semelhantes entre as Frações I e II.

ISOBE et alii (1988), caracterizaram uma lipase de *Penicillium cyclopium* em PNPL e concluíram que a atividade máxima da enzima foi em tampão fosfato de potássio pH 6,0.

As lipases de *Aspergillus niger* foram caracterizadas por FUKUMOTO et alii (1963) e por SUGIHARA et alii (1988), ambos os autores observaram pH ótimo de 5,6 e pH na faixa de 4,5-5,5 respectivamente.

HOOVER et alii (1973, descreveu como pH ótimo de atividade 6,2 para lipase de *Aspergillus flavus* .

KIM & CHUNG 1989, estudando hidrólise de óleo de dendê por lipase de *Rhizopus arrhizus* encontrou um pH 7,0 como o máximo de atividade em diferentes tampões com pHs de 3,0-9,0 a 30°C.

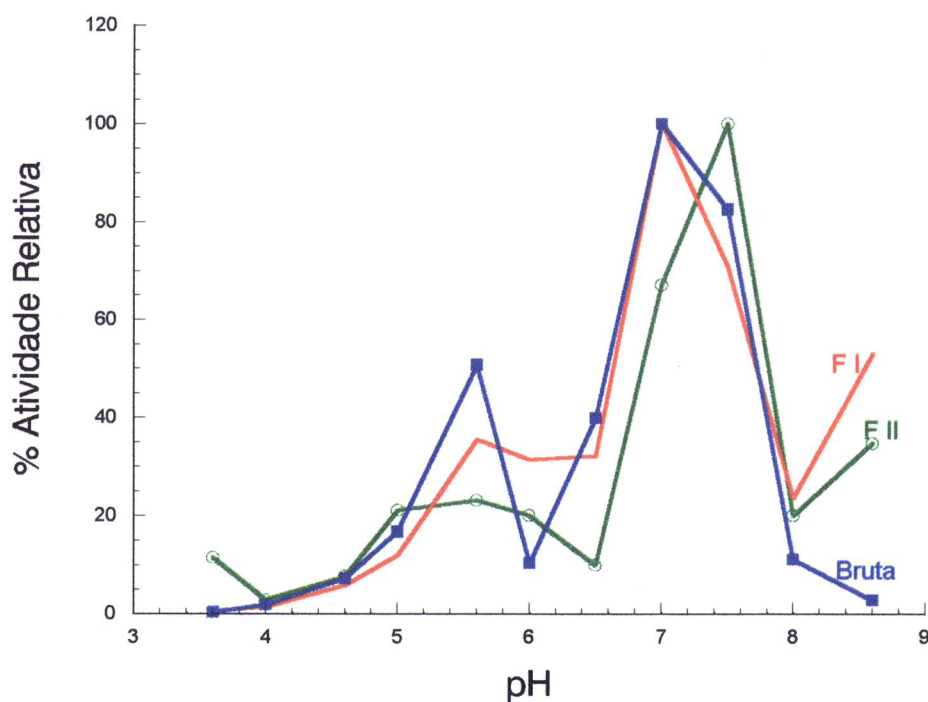


Figura 9 - Efeito do pH na atividade da lipase bruta e parcialmente purificada de *Rhizopus sp.*

4.4.2 Efeito do pH na estabilidade da enzima

Este estudo foi realizado de acordo com descrito no item 3.2.6.2., e seus resultados podem ser visualizados na Figura 10. A enzima bruta foi mais estável na faixa 4,6 - 7,5, enquanto que a Fração I apresentou estabilidade a pH 3,6 - 5,6 e a Fração II foi mais estável a pH 6,0 - 7,5.

FUKUMOTO et alii (1963), estudaram lipases de *Aspergillus niger* e obtiveram pHs de estabilidade ao redor de 2,2-6,8 por 24 horas a 30°C.

IWAI et alii (1988), estudaram duas lipases de *Penicillium cyclopium* e encontraram pHs de estabilidade para a lipase **B** 4,0-6,5 e para lipase **A** entre 6,5-9,0, em um sistema de reação a 30°C por 17 horas.

IWAI & TSUJISAKA (1974), purificaram e estudaram as características de três lipases de *Rhizopus delemar* a 30°C por 15 horas mostrando que a lipase **A** foi mais estável na faixa pH de 3,0-8,0 e as lipases **B** e **C** foram mais estáveis a pH 4,0-7,0 observaram ainda que não houve diferenças entre a estabilidade da lipase **B** crua e purificada.

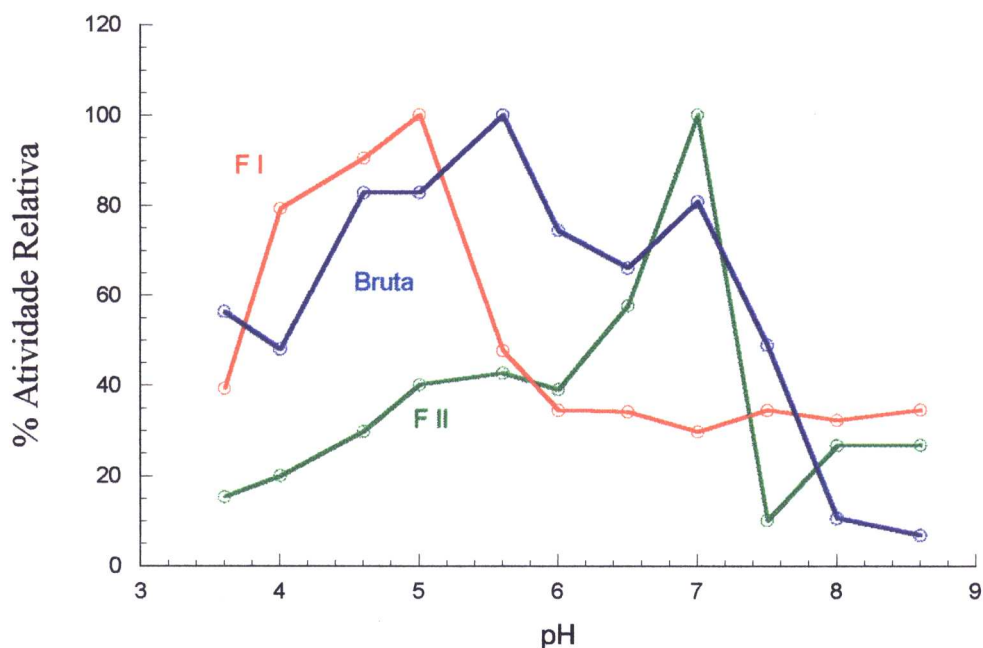


Figura 10 - Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta e parcialmente purificada de *Rhizopus sp*, em substrato PNPL

4.4.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima

A temperatura ótima foi determinada conforme o descrito no item 3.2.6.3., sendo os resultados, como mostra a Figura 11, onde a enzima bruta mostrou-se mais ativa à temperaturas de 40°C-50°C enquanto a fração I teve um percentual de atividade muito melhor a 40°C e a fração II foi mais ativa a 38°C.

A lipase de *Penicillium cyclopium* mostrou-se mais ativa a temperatura de 40°C, em substrato sintético PNPL no estudo de ISOBE et alii 1988.

A temperatura ótima para as lipases **A**, **B** e **C** de *Rhizopus delemar* foi a 30°C para a lipase **A** e 35°C para as lipases **B** e **C**, entretanto

para a lipase B bruta foi de 40°C em estudos realizados por IWAI & TSUJISAKA 1974.

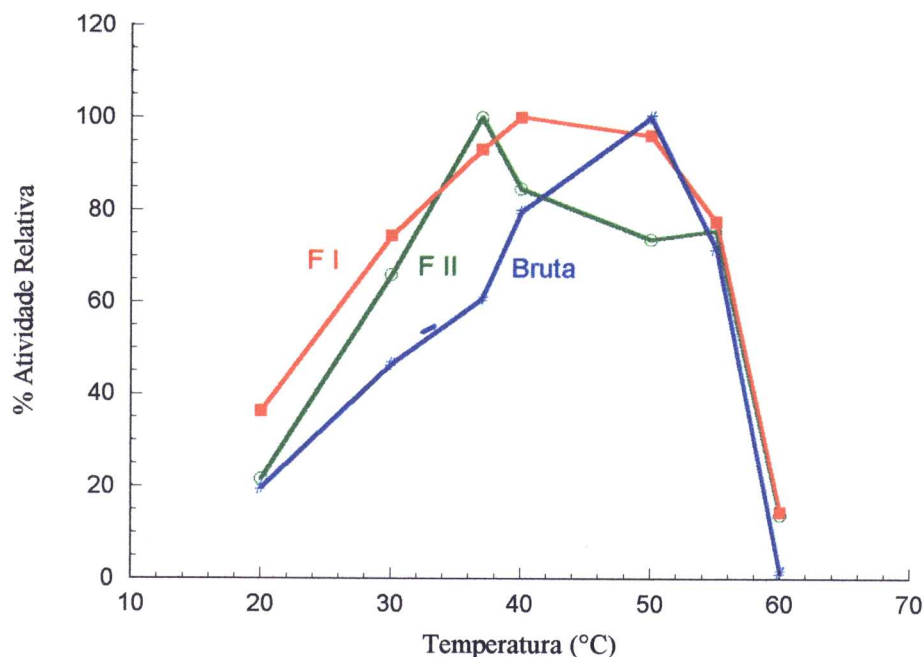


Figura 11 - Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta e parcialmente purificada de *Rhizopus sp* em substrato PNPL.

ISHIHARA et alii 1975, encontraram que a lipase de *Mucor javanicus* teve atividade máxima a 37°C e a atividade foi rapidamente perdida acima de 40°C

4.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

A termoestabilidade da lipase de *Rhizopus sp* foi determinada de acordo com o sistema de reação descrito no item 3.2.6.4. A Figura 12 demonstra os resultados obtidos. Como pode ser verificado a enzima bruta foi mais estável na faixa 40 - 55°C mantendo um percentual de atividade relativa superior aos 85%. As Frações I e II permaneceram estáveis na faixa de

temperatura entre 20 - 40°C com percentual relativo de atividade em torno de 80 - 85%, para as duas Frações respectivamente.

IWAI & TSUJISAKA (1974), colocaram as soluções de enzimas a pH 5,6 por 15 min. em diferentes temperaturas e concluíram que as lipases **B** e **C** foram estáveis abaixo de 45°C e que a lipase **A** foi estável ao redor de 60°C em estudos realizados com a caracterização das lipases de *Rhizopus delemar*

HAAS et alii (1992), estudaram as propriedades de uma lipase extracelular de *Rhizopus delemar* e observaram a termoestabilidade na qual a enzima foi instável acima de 30°C e 50% de sua atividade foi perdida durante 15min. a 42°C e totalmente inativada acima de 50°C por 5 minutos.

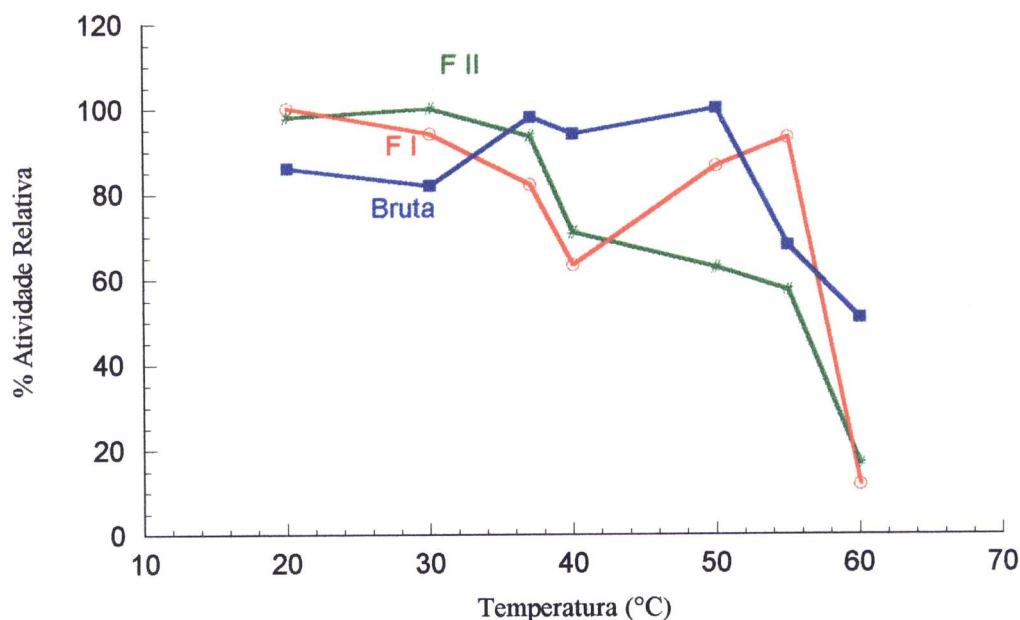


Figura 12 - Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta e parcialmente purificada de *Rhizopus sp*, em substrato PNPL.

4.4.5 Efeito da concentração do substrato na atividade da enzima

Este estudo foi determinado de acordo com item 3.2.6.5 e seus resultados podem ser vistos nas figuras 13 e 14.

A constante de Michaelis-Mentem (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) foram determinadas com o sistema gráfico de LINEWEAVER & BURK (1934), onde foram obtidos os valores de K_m de $5,5 \times 10^{-2}$ e $7,6 \times 10^{-2}$ mmoles de paranitrofenol/min/mg de proteína para o substrato paranitrofenil-laurato para a Fração I e Fração II respectivamente. E os valores de V_{max} foram 1,99 e 1,19 μ moles de paranitrofenol/min/mg de proteína utilizando-se o substrato paranitrofenil-laurato para as Frações I e II respectivamente.

HOOVER et alii (1973), ao estudarem as propriedades da lipase fúngica que hidrolisou óleo de côco, determinaram o K_m para o substrato trilaurina e tributirina encontrando $9,09 \times 10^{-4}$ e $1,43 \times 10^{-3}$ M respectivamente.

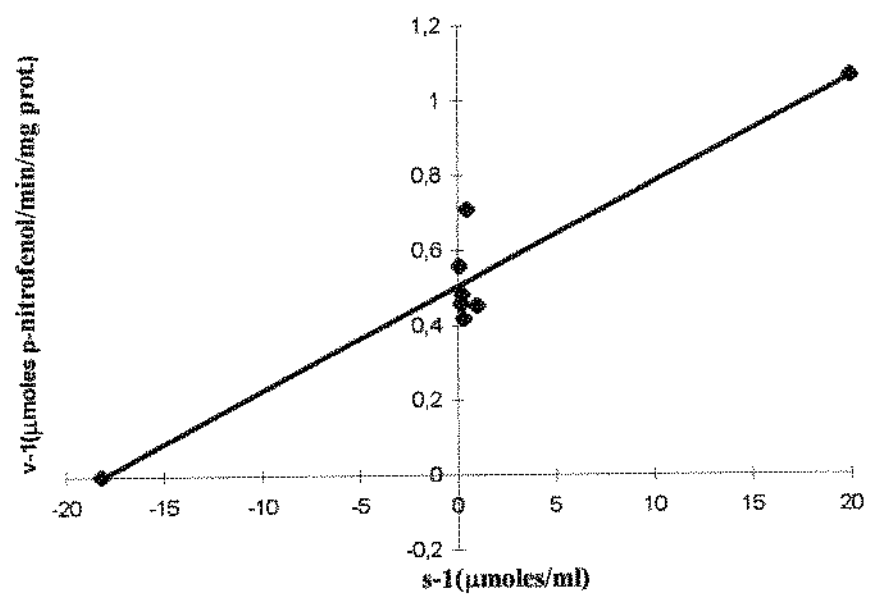


Figura 13 - Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil-laurato na atividade da lipase parcialmente purificada (Fração I), de *Rhizopus sp.*

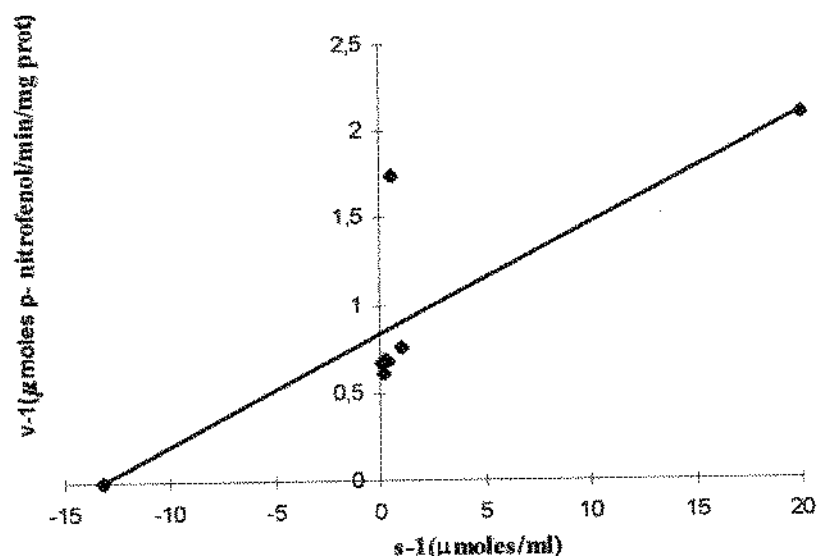


Figura 14- Efeito da concentração do substrato p-nitrofenil-laurato na atividade da lipase parcialmente purificada (Fração II), de *Rhizopus sp.*

4.5. Determinação da porcentagem de hidrólise em diferentes substratos em relação ao tempo de reação

A hidrólise de glicerídeos pela lipase bruta de *Rhizopus sp* foi realizada de acordo com item 3.2.7 e a ação hidrolítica pode ser vista nas Figuras 15 e 16, onde o percentual de hidrólise foi significativamente maior sobre gordura de côco. O óleo de mamona, óleo de oliva e gordura do leite de cabra, apresentaram valores decrescentes nesta ordem. Os percentuais obtidos foram 45, 40, 35 e 25% respectivamente.

TAHOUN et alii (1987), em estudos de hidrólise sobre triglicerídeos sintéticos e naturais com lipase intracelular de *Aspergillus niger*

constatarem a hidrólise preferencial sobre tripalmitoilglicerol (61%) e trioleilglicerol (46%), semelhante a lipase extracelular de alguns fungos.

CHEN & YANG (1992), utilizaram lipases de *Candida cylindracea* e *Rhizopus arrhizus* em um sistema de imobilização de enzimas e foram efetivas para liberar ácido graxo de cadeia curta da gordura do leite.

LINFIELD et alii (1984), estudaram a hidrólise de sebo, óleo de côco e óleo de oliva pela lipase de *Candida rugosa* e viram que a reação não foi afetada pela temperatura na faixa de 24°C-46°C; óleo de oliva foi mais rapidamente hidrolisado comparado sebo e óleo de côco.

BENZONANA (1974), ao estudar lipase extracelular de *Rhizopus arrhizus* constatou sua semelhança com a lipase pancreática por ter alguma especificidade por ácidos graxos de cadeia longa, mas ao contrário da lipase pancreática a de *Rhizopus arrhizus* atua sobre micelas de triacilgliceróis com ácidos graxos de cadeia curta e é inibida por sais biliares em altas concentrações.

JENSEN (1983-a), em estudos realizados sobre lipases, constatou que trioleilglicerol é um substrato ideal para lipases, e também que substratos sólidos são mais lentamente hidrolisados, entretanto ressaltou a importância das condições de atividade como pH geralmente em torno de 7,0-9,0 e temperaturas na faixa de -20°C-60°C.

HOOVER et alii (1973), obtiveram hidrólise em gordura de côco com lipase de *Aspergillus niger* onde ácidos graxos de cadeia curta foram mais rapidamente hidrolisados quando comparados a triestearina.

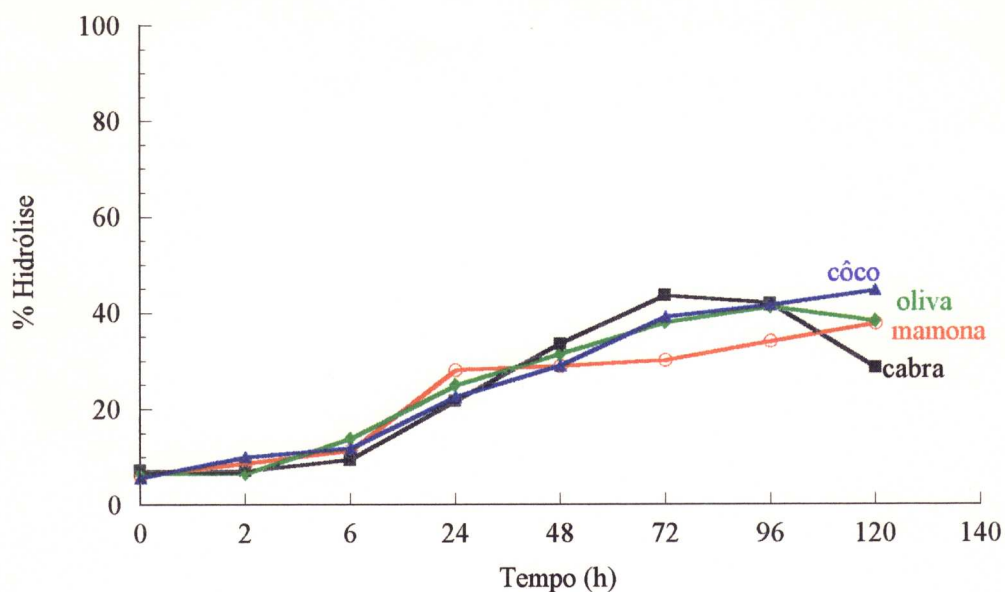


Figura15 - Efeito do tempo de reação na hidrólise de diferentes substratos pela lipase de *Rhizopus sp.*

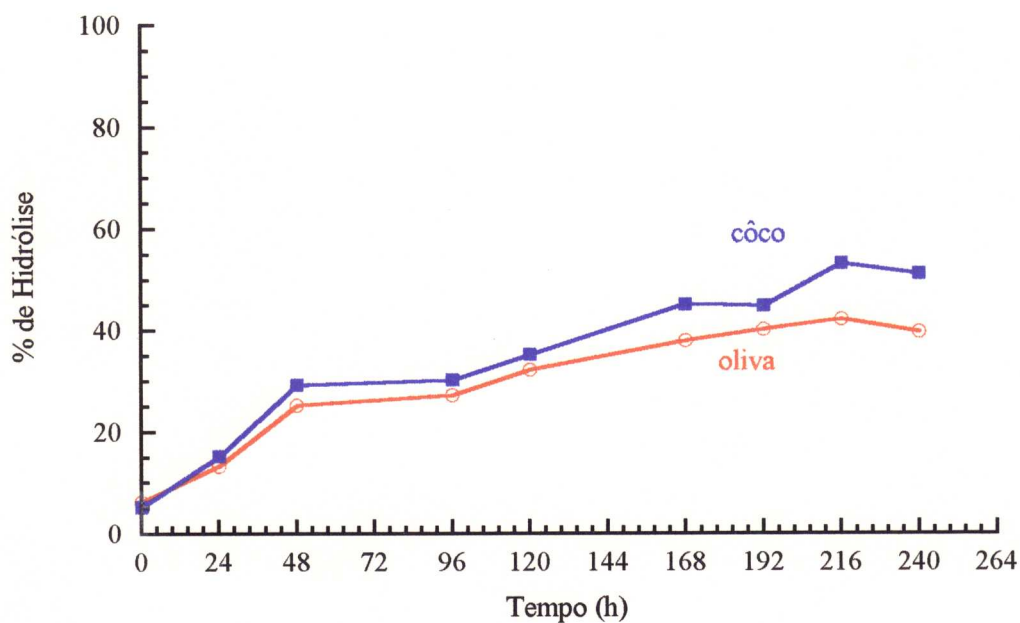


Figura 16- Efeito do tempo de reação na hidrólise dos substratos gordura de côco e óleo de oliva pela ação da lipase de *Rhizopus sp.*

A Figura 17, mostra a Cromatografia em Camada Delgada (TLC), os produtos da hidrólise sobre o substrato óleo de oliva, pela lipase bruta e parcialmente purificada(Fração I e Fração II), com a formação de mono e diglicerídeos. Pode-se observar que a forma de atuação das duas Frações é igual, pois são obtidos os mesmos produtos de hidrólise.

LINFIELD et alii (1984), estudaram a cinética de hidrólise em banha, gordura de côco e óleo de oliva utilizando lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. Sendo as duas primeiras capazes de hidrolisar todos os três substratos.

TOROSSIAN & BELL (1991), obtiveram como produtos de hidrólise da lipase de *Aspergillus niger*, ácido oleico, 1,2-dioleína, 1-monoleína e 2-monoleína. A lipase de *Aspergillus niger*, segundo estes autores é específica e hidrolisa as ligações ésteres dos triglicerídeos nas posições 1 e 3.

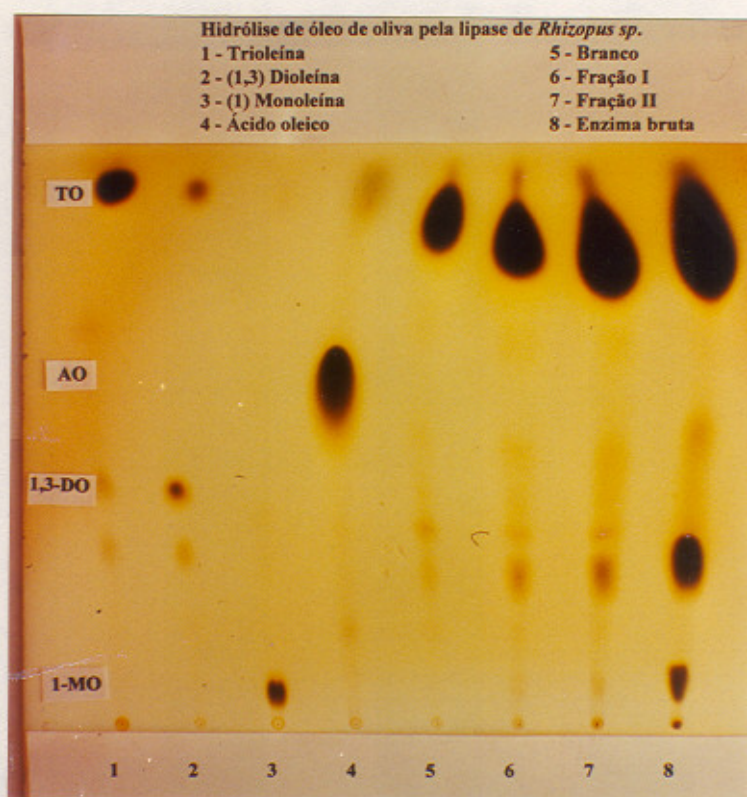


FIGURA 17- Cromatografia em Camada Delgada dos produtos da hidrólise no substrato óleo de oliva pela lipase de *Rhizopus sp.*

- | | |
|---------------------------|--------------|
| 1. TO- Trioleína | 5. Branco |
| 2. AO- Ácido oleico | 6. Bruta |
| 3. 1,3-DO- (1,3) Dioleína | 7. Fração I |
| 4. 1-MO- (1)-Monoleína | 8. Fração II |

A figura 18 ilustra os produtos da hidrólise na Cromatografia em Camada Delgada da lipase bruta e parcialmente purificada(Fração I e Fração II), sobre o substrato gordura de côco.

ALFORD & PIERCE (1961), medindo a atividade da lipase de algumas linhagens como, *Pseudomonas fragii*, *Staphilococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium sp.*, em emulsões de óleo de côco, óleo de milho e toucinho relataram que óleo de côco foi o primeiro a ser hidrolisado dentre os três substratos testados para todas as lipases microbianas de diferentes origens. As enzimas foram ativas a baixas temperaturas e sua atividade foi determinada pelo tipo e posição do ácido graxo no triacilglicerol.

TAHOUN et alii (1987), realizaram experimentos com uma lipase intracelular de *Aspergillus niger* e observaram que após 15 minutos de hidrólise, cerca de 9,5% de monoglicerídeos e 13,8% de diglicerídeos foram obtidos como produtos finais. Tendo uma produção máxima de ácidos graxos livres após 30 minutos de reação.

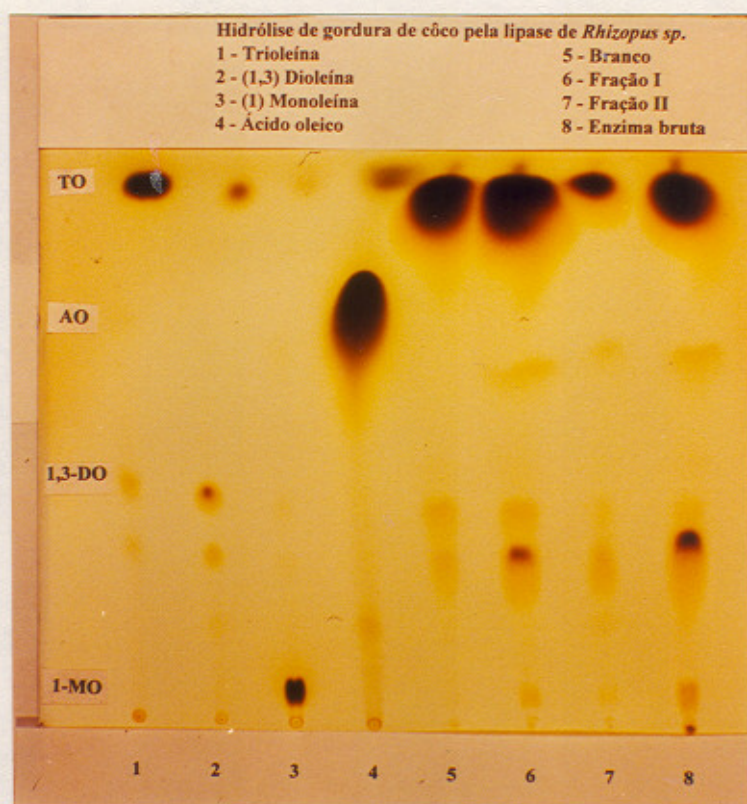


FIGURA 18- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos da hidrólise de gordura de côco pela lipase de *Rhizopus sp.*

- | | |
|---------------------------|--------------|
| 1. TO- Trioleína | 5. Branco |
| 2. AO- Ácido oleico | 6. Bruta |
| 3. 1,3-DO- (1,3) Dioleína | 7. Fração I |
| 4. 1-MO- (1)-Monoleína | 8. Fração II |

5. CONCLUSÕES.

- 1- A enzima teve uma produtividade de 1 grama de extrato enzimático bruto para cada 72 gramas de farelo de trigo em meio semi-sólido.
- 2- A lipase bruta de *Rhizopus sp.* apresentou condições ótimas de atividade a pH 6,0 - 6,5 e temperatura de 40°C. Demonstrou estabilidade a pH na faixa de 6,0 - 7,5 e as temperaturas na faixa de 40°C - 55°C, mostrando ser termorresistente.
- 3- A lipase bruta hidrolisou melhor gordura de côco (45%), quando comparado a óleo de oliva (38%), óleo de mamona (35%) e gordura do leite de cabra (30%).
- 4- A lipase bruta foi parcialmente purificada e suas Frações (I e II) tiveram características bioquímicas semelhantes quando analisadas com o substrato sintético PNPL e na forma de hidrólise os substratos óleo de oliva e gordura de côco.
- 5- Nos estudos para melhorar a atividade da enzima constatou-se que íons cálcio melhoram significativamente a atividade quando comparado a íons magnésio nas mesmas concentrações.

6- Os valores de K_m foram $5,5 \times 10^{-2}$ para Fração I e $7,6 \times 10^{-2}$ para Fração II.

7- A enzima teve sua atividade reduzida em 87% quando submetida a tratamento em temperatura superior a 70°C durante 60 minutos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- AKTHAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; CHUGTAI, M.I.D. . Lipase Induction in *Mucor hiemalisi*. Applied and Environmental Microbiology, v. **40**, n. 2, p. 257-263, 1980.
- 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, v. **26**, p. 512-523, 1961.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. AOCS. Official Method, Cd 3-25, p. 1, 1993.
- BENZONANA, G. Some properties of an exocellular lipase from *Rhizopus arrhizus*. Lipids, v. **9**, n. 3, p. 166-173, 1974
- CHEN, JYH-PING & YANG, B. Enhancement of release of short-chain fatty acids from milk fat with immobilized microbial lipase. Journal. of Food Science, v. **57**, n.3, p.781-782, 1992.
- DRAVANOV, K.D.; RAKHIMOV, A.K.D.; RAKHIMOV, M. Stabiization of lipase from fungus *Rhizopus microsporus*. Soviet Biotechnology, v. **3**, p. 368-372, 1988.
- ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.& FARRÉS, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H 13. Biotechnology Letters, v. **12**, n.3, p. 209-214, 1990.

- FUKUMOTO J., IWAI M., TSUJISAKA Y. Studies on lipase I. Purification and crystralization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. Journal Genetic Applied Microbiology, v. **9**, n. 3, 1963.
- HAAS, M.J.; CICHOWICZ, D.J.; BAILEY, D.G. Purification and Characterization of an extracellular lipase from the *Rhizopus delemar*. Lipids, v. **27**, n.8, p.571-576, 1992.
- HOOVER, R.; LAURENTIUS, S.F.; GUNETILEK, K.G. Spoilage of coconut oil Purification and Properties of Fungal Lipase that attacks coconut oil. Journal of American Oil Chemist's Society, v. **50**, n. 3, p. 64-67, 1973.
- ISHIHARA, H.; OKUYAMA, H.;IKEZAWA, H.;TEJIMA, S. Studies on Lipase from *Mucor javanicus** , Purification and Properties. Biochimica Biophysica Acta n. **388**, p. 413-422, 1975.
- ISOBE, K.; AKIBA, T.; AMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. Agricultural Biological Chemistry, v. **52**, n. 1, p. 41-47, 1988.
- IWAI, M.; TSUJISAKA, V.; FUKUMOTO.;Studies on lipase V. Effect of irons ions on the *Aspergillus niger* lipase. Journal Genetic.Applied Microbiology, v. **16**, p. 81-90, 1970.

- IWAI, M.& TSUJISAKA, Y. The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. Agricultural Biological Chemistry, v **38** (6), p.1241-1247, 1974.
- IWAI, M.; TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S. The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Westring. Agricultural Biological Chemistry, v. **39**, n. 5, p. 1063-1070, 1975.
- JENSEN, R.G.; DEJONG, F.A.; CLARK, R.M.(a) Determination of lipase specificity. Lipids, v. **18**, n.3, p.239-252, 1983.
- JENSEN, R.G.(b); Detection and determination of lipase activity from various sources. Lipids, v. **18**, n.9, p. 650-657, 1983.
- KIM, T.; CHUNG, K. Some characteristics of palm kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelle of AOT in isooctane, and additive effects. Enzyme Microbiology and Technology, v. **11**, p. 528-532, August, 1989.
- KOHNO, M.; KUGIMIYA, W.; HASHIMOTO, Y.; MORITA, Y. Purification, Characterization, and Crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. Bioscience, Biotechnology, Biochemical. V. **58**(6), p. 1007-1012, 1994.
- LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATI, J. Short-chain flavour esters synthesis by microbial lipases. Biotechnology Letters, v. **12**, n. 8, p. 581-586, 1990.

- LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme,dissociation constants. Journal of American Chemistry, v. **56**, p. 658-666, 1934.
- LINFIELD, W.M.; BARAUSKAS, R.A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S. Enzymatic fat hydrolysis and syntesis. Journal of American Oil Chemist's Society, v. **61**, n. 2, p. 191-195, 1984.
- LI ZU YI & WARD, O.P. Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acids by microbial lipase in organic solvente. Journal of Industrial Microbiology, v.**13**, p.49-52, 1994
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F.; RANDALL,R.F. Protein measurement with the Folen-phenol reagente. Journal of Biological Chemistry, v. **193**, p. 265-275, 1951.
- McNEILL, G.P.; SHIMIZU, S.; YAMANE, T. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. Journal American Oil Chemist's Society, v. **67(11)**, p. 779-783, 1990.
- MACRAE, A.R. Lipase catalyzed interesterification of oils and fats. Journal American Oil Chemist's Society, **V.60**, N.2, P.291-294, 1983.
- MACRAE, A.R.; HAMMOND, R.C. Present and Future Applications of Lipase. Biotechnology Letters, v. **9(8)**, 601-604, 1987.

- MEFFERT, A. Technical uses of fatty acids esters. Journal American Oil Chemist's Society, v. **61(2)**: 255-258, 1984.
- MOJOVIC, L.; SILER-MAKINKOVIC, S.; KUKIC, G.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalized interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. Enzyme Microbiology Technology, v. **15**, p. 438-443, May, 1993.
- NAGAOKA, A.; YAMADA, Y.; KOAZE, Y. Studies on *Mucor* lipase. Part 1. Production of lipases with a newly isolated *Mucor* sp. Agricultural Biological Chemistry, v. **33**, n.3 p.299-305, 1969.
- NAIR, C.S.; BONE, D.H. Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor. Biotechnology Letters, v. **9**, n.8, p. 601-604, 1987.
- 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, v. **66(4)**, p. 441-448, 1988.
- OKEKE, C.N.; OKOLO, B.N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. Biotechnology Letters, v. **12**, n. 10, p. 747-750, 1990.
- OKOMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA. Positional specificities of kinds of microbial lipases. Agricultural Biological Chemistry, **40(4)**, 660-665, 1976.

- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Purification and properties of partial glyceride hydrolysis of *Penicillium cyclopium* M1. Journal Biochemistry, v.87, n. 1, p. 205-211, 1980.
- OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agricultural Biological Chemistry. v.45, n.1, p. 185-189, 1981.
- OKUMURA, J.; KINSELLA, J.E. Methyl ketone formation by *Penicillium camembertii* in model systems. Journal of Dairy Science, v. 68, n. 1, p. 11-15, 1985.
- 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, v. 56, n. 6, p. 593-598, 1978.
- PARK, Y. K.; PASTORE, G.M.; ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by combined lipase system. Journal American Oil Chemist's Society, v.65, n.2, p.252-254, 1988.
- PETROVIC, S.E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC, A.; FUJITO, I.F.; BANKA, L. Effect of various carbon sources on microbial Lipases biosynthesis. Biotechnology Letters, v. 12(4), p. 299-304, 1990.
- POSORSKE, L.H. Industrial scale application of enzymes to fats and oil industry. Journal American Oil Chemist's Society, v.61, n 11, 1984.

- RIVERA-MUÑOZ, G.; VALENCIA, T.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A.
Production of microbial lipases in a solid state fermentation system.
Biotechnology Letters, v. 13, n. 4, p. 277-280, 1991.
- SHIPE, W.F. A study of the relative specificity of lipases produced by
Penicillium roquefort and *Aspergillus niger*. Archives Biochemistry, v.
30, p. 165-179, 1951.
- SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Purification and
characterization of *Aspergillus niger* lipase. Agricultural of Food
Chemistry, v.52, n. 6, p. 1591-1592, 1988.
- SUZUKI, M.; YAMAMOTO, H.; MIZUGAKI, M. Purification and General
Properties of a Metal-Insensitive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400.
Journal Biochemistry, n. 100, p. 1207-1213, 1986.
- TAHOUN, M.K.; MOSTAFA, E.; MASHALY R.; ABOU-DONIA, S. Lipase
induction in *Geotrichum candidum*. Milchwissenschaft. v.37, n.2, p.86-88,
1982.
- TAHOUN, M.K.; ALI, H.A. Specificity and glyceride synthesis by mycelial
lipases of *Rhizopus delemar*. Enzyme Microbiology and Technology, v.8, p.
429-432, July, 1986.

- TAHOUN, M.K.; EL KADEY, F.; WAHBA, A.A. Hydrolysis of shyntetic and natural triglycerides by an intracellular lipase from *Aspergillus niger*. Fat Science Technology, v. 9: 261-263, 1987.
- TAIPA, M.A.; AIRES-BARROS,M.R.; CABRAL, J.M.S. Purification of lipases. Journal of Biotechnology, v. 26, p. 111-142, 1992.
- TANAKA, T.; ONO, E.; ISHIHARA, M.; YAMANAKA, S.; TAKINAMI, K. Enzymatic acyl exchange of triglyceride in n-Hexane. Agricultural and Biological Chemistry, v.45, n.10, p.2387-2389, 1981.
- TOROSSIAN, K.; BELL, A.W. Purification and Characterization of an acid-resistant triacilglycerol lipase from *Aspergillus niger*. Biotechnology Applied Biochemistry, v. 13, p. 205-211, 1991.
- TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA,Y. A comparative study on some properties of fungal lipase. Proceedings of IV International Fermentation Symposium: p. 315-320, 1972.
- TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.;IWAI, M. . Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. Biochimica et Biophysica Acta, v.489, p. 415-422, 1977.
- XIA, J.; CHEN, X.; NNANNA, J.A. Activity and Stability of *Penicillium cyclopium* Lipase in Surfactant and Detergent Solutions. Journal American Oil Chemistry Society. v. 73, n° 1, p. 115-120, 1996.

YAGI, T.; NAKANISHI, T.; YOSHIZAWA, Y.; FUKUI, F. The enzymatic acyl exchange of phospholipids with lipases. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 69, n. 1, p. 23-25, 1990.

YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of mono and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camembertii* U-150. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 34, p. 720-725, 1991.

WATANABE, T., SUZUKI, Y., SAGESAKA, Y. & KOHASHI, M. Immobilization of lipases on polyethylene an application to perilla oil hydrolysis for production of α -linolenic acid. Journal Nutrition Science Vitaminol, v.41, p.307-312, 1995.