

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO  
BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES DE LIPASE DE  
*GEOTRICHUM sp.***

Prócer

Este exemplar corresponde a uma cópia  
feita da tese depositada por Gabriela

Alves Macêdo e  
apresenta pela  
Associação de Professores

em 19/05/95

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



Gabriela Alves Macêdo  
Eng. de Alimentos

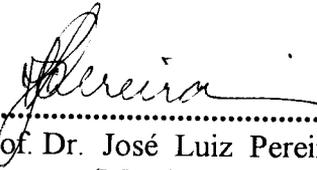
Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> Gláucia M. Pastore  
Orientadora



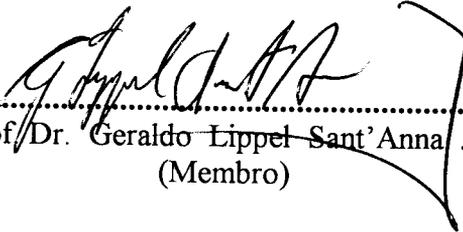
**BANCA EXAMINADORA**



.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore  
(Orientadora)



.....  
Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(Membro)



.....  
Prof./Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr.  
(Membro)



.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hélia Harumi Sato  
(Membro)

Campinas, 19 de maio de 1995.

*“ A história é um combate do espírito, uma aventura, e, como todas as proezas humanas, só alcança sucessos parciais, inteiramente relativos, que não são proporcionais à ambição inicial; como de todo combate travado com as desconcertantes profundidades do ser, o homem dela retorna com um agudo sentimento de seus limites, de sua fraqueza, de sua humildade. ”*

*Henri Irénée Marrou*

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Pastore pela constante e valiosa orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho. Exemplo de Professora e Cientista.

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pelos ensinamentos e exemplo de trabalho e dedicação.

Ao Prof. Dr. José L. Pereira, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Geraldo Lippel Sant'Anna Jr. pelo auxílio na redação final da tese.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Hélia Harumi Sato pelo auxílio e atenção dispensados.

À Norma Teruko Miya pela valiosa orientação, inestimável paciência e dedicação.

À Maria das Dores Oliveira, pela amizade e colaboração prestada.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA , em especial à nossa equipe, que tanto nos incentivou.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos , pela constante colaboração.

Aos demais amigos e colegas pelo estímulo para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelas sugestões ao projeto realizado.

# ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
RESUMO .....	vii
SUMMARY .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	38
3.1 Materiais .....	38
3.2 Métodos .....	40
3.2.1 Isolamento de microrganismos .....	40
3.2.2 Estudo do meio de cultivo para isolamento e seleção de linhagens produtoras de lipase.....	40
3.2.3 Estudo do sistema de reação apropriado para a detecção de atividade lipolítica de leveduras .....	41
3.2.4 Seleção de linhagens produtoras de lipase.....	43
3.2.5 Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica da linhagem nº 212, e conservação da linhagem.....	44
3.2.6 Estudo de parâmetros para produção de enzima pela linhagem nº 212, selecionada como melhor produtora de lipase	
3.2.6.1 Seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por <i>Geotrichum sp</i> .....	44
3.2.6.2 Estudo do efeito da incorporação de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por <i>Geotrichum sp</i> .....	46
3.2.6.3 Efeito da temperatura de fermentação na produção de lipase por <i>Geotrichum sp</i> .....	46
3.2.6.4 Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase por <i>Geotrichum sp</i> .....	46
3.2.7 Produção de enzima bruta.....	47
3.2.8 Determinação da atividade enzimática de lipase .....	47
3.2.9 Fracionamento com sulfato de amônio .....	48

3.2.10	Caracterização bioquímica da lipase bruta	
3.2.10.1	Efeito do pH	48
3.2.10.1.1	Determinação do pH ótimo	48
3.2.10.1.2	Determinação do pH de estabilidade	49
3.2.10.2	Efeito da temperatura	49
3.2.10.2.1	Determinação da temperatura ótima	49
3.2.10.2.2	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima	49
3.2.11	Hidrólise de óleo de oliva por lipase bruta de <i>Geotrichum sp.</i>	50
3.2.12	Hidrólise de vários substratos por lipase bruta de <i>Geotrichum sp.</i>	50
3.2.13	Determinação do Número de Saponificação	51
3.2.14	Cromatografia em Camada Delgada ( TLC ) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva por ação de Lipase de <i>Geotrichum sp.</i>	51
3.2.15	Influência de sais minerais na atividade de lipase bruta	51
3.2.16	Influência de inibidores na atividade de lipase bruta	52
3.2.17	Estudo da especificidade da enzima lipase bruta de <i>Geotrichum sp.</i>	52
3.2.18	Purificação da lipase de <i>Geotrichum sp.</i>	
3.2.18.1	Fracionamento com Sulfato de Amônio	53
3.2.18.2	Cromatografia de Troca Iônica da lipase em Coluna de DEAE-Sephadex A-50	53
3.2.19	Caracterização bioquímica da lipase purificada	
3.2.19.1	Efeito do pH	54
3.2.19.2	Efeito da Temperatura	55
3.2.20	Influência de sais minerais na atividade de lipase purificada de <i>Geotrichum sp.</i>	55
3.2.21	Influência de inibidores na atividade de lipase purificada de <i>Geotrichum sp.</i>	56
3.2.22	Hidrólise de óleo de oliva por lipase purificada de <i>Geotrichum sp.</i>	56
3.2.23	Determinação de açúcares totais da enzima de <i>Geotrichum sp.</i>	56
3.2.24	Estudo da reação de esterificação por lipase de <i>Geotrichum sp.</i>	
3.2.24.1	Efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática	57
3.2.24.2	Efeito da temperatura no grau de esterificação enzimática	57
3.2.24.3	Efeito da concentração de lipase no grau de esterificação enzimática	58
3.2.25	Determinação do Peso Molecular por Eletroforese Vertical em gel SDS-Poliacrilamida	58

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Isolamento de microrganismos.....	61
4.2 Estudo do meio de cultivo para isolamento de linhagens produtoras de lipase.....	61
4.3 Estudo do sistema de reação apropriado para detecção de atividade lipolítica de leveduras.....	65
4.4 Seleção de linhagens produtoras de lipase.....	65
4.5 Caracterização morfofisiológica e bioquímica da linhagem nº 212 e conservação.....	67
4.6 Estudo de parâmetros para produção de enzima pela linhagem nº 212, selecionada como melhor produtora de lipase	
4.6.1 Seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	69
4.6.2 Estudo do efeito da incorporação de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	74
4.6.3 Efeito da temperatura e tempo de fermentação na produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	76
4.7 Produção de lipase pela linhagem de <i>Geotrichum sp.</i> .....	80
4.8 Purificação de Lipase.....	79
4.9 Caracterização da Lipase Bruta e Purificada	
4.9.1 Efeito do pH na atividade enzimática.....	83
4.9.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática.....	86
4.9.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	86
4.9.4 Estabilidade térmica da enzima.....	89
4.9.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática.....	89
4.9.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática.....	92
4.9.7 Hidrólise de glicerídeos pela lipase de <i>Geotrichum sp.</i> .....	93
4.9.8 Determinação de carboidratos totais na lipase.....	104
4.10 Estudo da reação de esterificação pela lipase de <i>Geotrichum sp.</i> .....	104
4.11 Eletroforese Vertical em gel SDS .....	108
5. CONCLUSÕES.....	114
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

# ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Página</b>
Tabela 1	
Seleção do meio de cultivo para produção de lipase, usando linhagem <i>Candida rugosa</i> NRRL 1446.....	64
Tabela 2	
Seleção do método para determinação de atividade lipolítica usando linhagem <i>Candida rugosa</i> NRRL 1446.....	66
Tabela 3	
Características Fisiológicas e Bioquímicas da linhagem nº212.....	72
Tabela 4	
Purificação da lipase de <i>Geotrichum sp</i> .....	82
Tabela 5	
Características bioquímicas de lipases microbianas.....	85
Tabela 6	
Efeito de sais minerais na atividade de lipase purificada e bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	91
Tabela 7	
Efeito de inibidores de enzimas na atividade de lipase bruta e purificada de <i>Geotrichum sp</i> .....	94

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	
Representação do modo de ação de enzimas lipolíticas.....	62
FIGURA 2	
Sequência das reações de hidrólise de óleos e gorduras por ação de lipases.....	63
FIGURA 3	
Seleção da linhagem melhor produtora de lipase.....	68
FIGURA 4	
4.A) Fotografia linhagem nº 212.....	70
4.B) Fotomicrografia com 400 x de aumento em microscópio óptico.....	71
FIGURA 5	
Seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	73
FIGURA 6	
Estudo do efeito da adição de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	75
FIGURA 7	
7.A) Efeito da temperatura de fermentação na produção de enzima por <i>Geotrichum sp.</i> .....	77
7.B) Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase por <i>Geotrichum sp.</i> .....	78
FIGURA 8	
Fluxograma de produção e purificação de lipase de <i>Geotrichum sp.</i> .....	80
FIGURA 9	
Cromatografia de lipase em Coluna DEAE-Sephadex A-50.....	81
FIGURA 10	
Efeito do pH na atividade de lipase bruta e purificada.....	84
FIGURA 11	
Efeito do pH na estabilidade de lipase bruta e purificada.....	87

FIGURA 12	Efeito da temperatura na atividade de lipase bruta e purificada.....	88
FIGURA 13	Estabilidade térmica da lipase bruta e purificada.....	90
FIGURA 14	14.A) Efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	95
	14.B) Cromatografia em Camada Delgada ( TLC) dos produtos da hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	96
FIGURA 15	Cromatografia em Camada Delgada ( TLC) dos produtos da hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase pura de <i>Geotrichum sp</i> .....	97
FIGURA 16	16. A) Porcentagem de hidrólise de vários substratos por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	99
	16. B) Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de hidrólise de vários substratos por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	100
	16. C) Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de hidrólise de vários substratos por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	101
FIGURA 17	Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de hidrólise por ação da lipase bruta de <i>Geotrichum sp</i> .....	102
FIGURA 18	Efeito da Proporção Molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática.....	105
FIGURA 19	Efeito da temperatura no grau de esterificação enzimática.....	106
FIGURA 20	Efeito da concentração de lipase no grau de esterificação enzimática.....	107
FIGURA 21	Eletroforese Vertical em Gel SDS-Poliacrilamida.....	109

## RESUMO

Setecentas linhagens de leveduras foram isoladas de amostras de solo, frutas, água, resíduos industriais e testadas quanto à capacidade de hidrolisar glicerídeos através da produção de lipase extracelular.

Destas linhagens, cinco foram pré selecionadas como produtoras de lipase. Foi encontrada uma linhagem identificada como *Geotrichum sp* que apresentou alta produção de lipase em meio de cultivo composto por 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 3% de extrato de levedura, 0.2 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , quando incubada a 30 °C por 48 horas com agitação de 100 rpm.

A lipase de *Geotrichum sp* hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturada e não tem afinidade pelo substrato p-nitrofenil laurato.

A lipase de *Geotrichum sp* foi purificada 16.5 vezes através de fracionamento com sulfato de amônio e Cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50. A enzima purificada foi caracterizada bioquimicamente verificando-se que possui duas subunidades de peso molecular estimado em 52000 e 57000, através de eletroforese vertical em gel SDS- poliacrilamida.

A lipase de *Geotrichum sp* apresentou atividade ótima na faixa de pH 5 a 8 a 45°C. A atividade enzimática foi acrescida em 45% na presença de 1 mM  $\text{MgSO}_4$  no sistema de reação. A enzima não sofreu ação inibitória na presença de p-cloromercuribenzoato quando pura.

A esterificação enzimática de ácido graxo e glicerol pela lipase de *Geotrichum sp* foi examinada e verificou-se que a enzima catalisou a reação de esterificação de ácido oleico em glicerol, com incorporação de 63% do ácido oleico após 2 horas de reação a 40°C.

## SUMMARY

The screening of lipase producing yeasts was performed including 700 strains of microorganisms which were isolated from samples of soil, fruits, and industrial residues.

It was found that five strains produced high activity of extracellular lipase and one of them produced exceptionally higher lipase activity. This strain was identified as *Geotrichum sp.*

The lipase from *Geotrichum sp* was produced by liquid fermentation in medium containing 1.5 % deffated soybean flour, 1% wheat flour, 3% yeast extract, 0.2 %  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , at 30°C for 2 days.

The lipase from *Geotrichum sp* hydrolysed preferentially esters of fatty acids with high insaturated chain and it did not hydrolysed the synthetic substrate p-nitrophenil laurate.

The lipase was purified by fractionation with ammonium sulfate and DEAE- Sephadex A-50 column cromatography. The purified lipase was characterized and was found that optimum pH and temperature were between 5 - 8, and 45°C, respectively.

The enzyme activity increased by the presence of  $\text{MgSO}_4$ , 0.1mM and was not inhibited in the presence of enzyme inhibitors.

Enzymatic esterification using glicerol and fatty acid by lipase from *Geotrichum sp* was also examined. It was found that reaction system esterified 63% triglyceride after 2 hours of reaction time at 40 °C.

The enzyme was shown to be constituted by two subunits. The molecular weight of the subunits was estimate to be 52000 - 57000 daltons by SDS-poliacrylamide gel.

## 1. INTRODUÇÃO

Lipases ( E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas que ocorrem nos reinos animal e vegetal. A sua função biológica é catalisar a hidrólise de triacilgliceróis para produzir ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. Essa reação é reversível e portanto essas enzimas catalisam a formação de acilgliceróis a partir de glicerol e ácidos graxos.

As lipases são hoje objeto de intenso estudo, principalmente pela possibilidade de serem produzidas em larga escala pelo crescimento de microrganismos em fermentadores e assim, serem utilizadas pela indústria.

O potencial de uso industrial das lipases em detergentes, biotransformações e reações de inter - e transesterificação tem despertado interesse por essas enzimas. Lipases com especificidade comprovada têm especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados não poderiam ser obtidos por processos químicos convencionais.

Na indústria alimentícia as lipases têm papel no desenvolvimento de sabores e odores específicos e característicos de alguns alimentos.

Do ponto de vista bioquímico, o mais importante aspecto das enzimas lipolíticas é o seu caracter único nas reações que catalisam, atuando em substratos insolúveis em água, ocorrendo na interface óleo/água.

O presente trabalho visou o isolamento e seleção de microrganismo produtor de lipase e o estudo de características bioquímicas da enzima produzida.

O microrganismo selecionado como melhor produtor de lipase foi utilizado para produção de enzima. A preparação bruta de lipase

extracelular de *Geotrichum sp* foi submetida à purificação e posteriormente caracterizada quanto às suas propriedades bioquímicas. Foram estudadas também as condições para reação de esterificação de glicerol e ácidos graxos pela enzima produzida.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CUTCHINS et alii, em 1952 (13), estudaram a influência da composição do meio de cultivo na produção de lipase pela levedura *Mycotorula lipolytica*, verificando que a presença de 0.05% de glucose aumentou a produção de lipase. Contudo, na presença de óleo de oliva e glucose como fonte de energia, não houve produção de atividade lipolítica.

SIERRA em 1957, (68 ) desenvolveu um método para detecção de atividade lipolítica microbiana. A produção de lipase foi detectada pela adição de Tweens ao meio nutriente. Foram utilizados 3 tipos de Tweens na concentração de 1% que diferem entre si no ácido graxo correspondente, sendo utilizado Tween 40 ( éster de ácido palmítico), Tween 60 ( éster de ácido esteárico) e Tween 80 ( éster de ácido oleico). O meio basal foi preparado com peptona 1%, NaCl 0.5% e  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01%, colocado em placas de Petri e o microrganismo foi inoculado. Neste método se o microrganismo apresentasse atividade lipolítica um halo opaco seria facilmente detectado ao redor das colônias. O método descrito apresentou a vantagem de permitir ótimo contato entre as células em crescimento e o substrato lipídico, sendo permitido estudos de especificidade da lipase e visualização direta dos resultados.

JENSEN et alii, em 1960 (28) estudaram as características e o modo de ação de lipases do leite e compararam com a lipase pancreática. Utilizando leite pasteurizado, leite homogeneizado e leite cru misturados em igual proporção incubaram por períodos de até 2 horas a 37 °C. Os resultados indicaram que lipases de leite são específicas para a posição primária dos glicerídeos da gordura do leite. A presença de 82.3% de 2-monoglicerídeos detectados no sistema de reação claramente indicam o tipo de especificidade das lipases presentes no leite de vaca.

Em 1961, ALFORD & PIERCE, (1) compararam as atividades lipolíticas de lipases microbianas de *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium sp*, utilizando emulsões de óleo de milho, óleo de côco, e toucinho como substrato, em sistemas reacionais com temperatura abaixo de 0°C. A taxa de lipólise em substratos congelados foi diretamente relacionada ao grau de insaturação dos mesmos. Foi observado que óleo de côco foi o mais rapidamente atacado dentre os três substratos para todas as lipases com exceção da lipase de *Geotrichum candidum*. A lipase produzida por este microrganismo foi a mais ativa em óleo de milho, e este efeito foi ainda mais evidente à temperaturas mais baixas, mostrando a preferência evidente desta lipase por ácidos graxos insaturados, sendo que o ácido oleico e linoleico compõem cerca de 99% dos ésteres de ácidos graxos hidrolisados por esta lipase. Os autores encontraram diferenças básicas entre as lipases microbianas de diferentes origens, sendo estas enzimas ativas à baixas temperaturas, e que o tipo de ácido graxo bem como a posição no triglicerídeo determina a atividade da lipase microbiana.

Em 1964, ALFORD & PIERCE (2) estudaram a atividade de lipase microbiana em gorduras naturais e triglicerídeos sintéticos. Neste estudo foram isolados 82 microrganismos, dos quais apenas 13 produziram lipase com atividade significativa, sendo selecionadas linhagens de *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus* e *Geotrichum candidum* dentre outras. A lipase de *Pseudomonas fragi* apresentou atividade lipolítica similar à lipase pancreática, atacando as posições primárias do triglicerídeo. Esta lipase, assim como a pancreática, ataca mono e diglicerídeo em taxas muito mais baixas do que quando atuam em triglicerídeos. A lipase produzida por *S. aureus* pode atacar tanto a

posição 2 como a 1 do triglicerídeo. Estes resultados foram obtidos utilizando triglicerídeos sintéticos. Com relação à lipase de *G. candidum* ficou evidenciada a preferência para ácido graxo insaturado, ácido oleico, independente de sua posição no triglicerídeo. Os demais microrganismos selecionados demonstraram o perfil de atividade similar as lipases de *P. fragi* e *S. aureus*.

JENSEN et alii, em 1965, (29) estudaram a especificidade de lipase produzida por *Geotrichum candidum* para o ácido cis-octadecenóico, constatando que esta enzima não hidrolisa o isômero trans do ácido oleico. Esta especificidade única apresentada pela lipase indicou, segundo os autores, que a enzima pode ter um sítio ativo relativamente largo ligando o carbono da carbonila e a dupla ligação, e que o comprimento dos últimos nove carbonos na cadeia de C18 parece ser importante porque ésteres de C16:1 são hidrolisados a taxa muito inferiores que os oleatos.

OTA et alii, em 1968, (53) começaram a estudar a indução de lipase de *Candida parapolitytica* por lipídeos e substâncias derivadas. Adicionaram vários ácidos graxos ao meio de cultivo e verificaram que os ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido ricinoleico, foram os mais efetivos na indução de lipase. Verificaram ainda que alguns ácidos graxos como ácido esteárico e linoleico foram responsáveis pela aceleração do crescimento celular. Dentre as outras substâncias que não eram ácidos graxos, Tween 20 e Span 20 foram os melhores indutores.

No mesmo ano, OTA et alii (54) verificaram o efeito de lipídeos no meio de cultura na produção de lipase por *Candida cylindracea*. Verificaram que a levedura em estudo produzia pouca atividade de lipase em meio sem lipídeo, ou ainda, pela adição de somente um tipo de lipídeo. Dentre vários esteróis testados como possíveis indutores o colesterol, na

concentração de 0.1%, mostrou ser o mais efetivo na indução de produção de lipase. Foram adicionados ainda ésteres de ácidos graxos junto ao colesterol, encontrando com a tripalmitina a melhor produção de lipase pela levedura *C. cylindracea*. Ao compararem os resultados obtidos com a levedura *C. paralipolytica* no trabalho anterior encontraram as seguintes diferenças:

1) Quanto ao requerimento de gordura ou esteróides no meio de cultura: Enquanto a levedura *C. cylindracea* requer além de um esteróide um tipo de gordura, a *C. paralipolytica* necessita de um tipo de gordura ou um tipo de esterol.

2) *Candida cylindracea* não produz lipase na presença de desoxicolato de sódio. Não há necessidade de que o indutor possua uma ligação éster.

O mecanismo pelo qual ocorre a indução de produção de enzima lipase ainda não foi elucidado.

MARKS et alii, em 1968 (41) estudando a especificidade de um sistema de lipases de *Geotrichum candidum* verificaram que apesar de já relatado na literatura que este microrganismo produz lipase extracelular e preferencialmente hidrolisa ácido cis-octadecenóico, proveniente de uma variedade de gorduras naturais e sintéticas, a aplicação desta lipase para a determinação da estrutura de triglicerídeo não é recomendada pela falta de informação sobre as propriedades e especificidade da enzima. Foram utilizados neste estudo quatro triglicerídeos possíveis de oleato e palmitato, variando-se o pH de incubação do sistema enzimático. No sistema de reação empregou-se goma arábica 1% como agente emulsificante, sendo confirmada a hidrólise preferencial de ácido oleico independente da posição no triglicerídeo. O pH ótimo de atividade foi verificado ser de 8.1 a 8.5 e não o pH usado em estudos prévios (pH

6.7), sendo que nas condições empregadas a extensão da digestão foi quase dobrada pelo aumento do pH de 6.7 para 8.5. Os autores relatam que a especificidade da lipase de *G. candidum* sugere um interessante exemplo de geometria do sítio ativo.

NAGAOKA et alii, em 1969 (46), estudaram 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%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0.2% de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH 6.5. A produção de lipase mostrou ser afetada pela fonte de nitrogênio do meio sendo a combinação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e farelo de soja a mais adequada. A enzima apresentou pH ótimo de 8.0 em óleo de oliva como substrato a 37°C.

LU & LISKA, em 1969 (38), purificaram e estudaram a lipase de *Pseudomonas fragi* quanto às suas características. Foi observado que a aeração do meio de cultura causou perda da atividade enzimática. A maior quantidade de atividade enzimática foi precipitada com 60% de saturação com sulfato de amônio. O fracionamento foi realizado com acetona a 4°C e a enzima foi altamente purificada por cromatografia em coluna de DEAE-celulose. A lipase de *P. fragi* demonstrou ser estável na forma precipitada por sulfato de amônio mas esta estabilidade diminuiu com a purificação. Esta observação exclui a possibilidade de que enzimas proteolíticas presentes no extrato bruto causassem a instabilidade da lipase de *P. fragi*, sendo possível que algumas substâncias presentes na lipase não purificada exercessem efeito protetor na estrutura da enzima.

TSUJISAKA et alii, em 1972 (76) compararam as propriedades das lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Com relação ao meio de cultura para produção de lipase foi verificado que *A. niger* produzia lipase em meio semi-sólido composto de farelo de trigo e  $\text{CaCO}_3$ . Os outros 3 fungos

produziram grande quantidade de lipase durante o crescimento em meio líquido. Este meio tinha como característica alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono. Para *P. cyclopium* o meio de cultura mais adequado continha farelo de arroz e água de maceração de milho. Segundo os autores todas as lipases produzidas podem ser classificadas na categoria de glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3 por sua ação catalítica. A ação de síntese das lipases sobre ácidos graxos e glicerol foi verificada produzindo monoglicerídeos, diglicerídeos e triglicerídeos. As lipases de *A. niger* e *R. delemar* demonstraram ter larga especificidade para vários ácidos graxos e grande atividade de síntese, em relação as duas outras lipases. A lipase de *P. cyclopium* é a que apresentou a menor taxa de esterificação. Todas as lipases foram ativadas pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ . Das observações feitas sobre a ativação da lipase de *A. niger* foi verificado que esta característica não ocorre no início da reação enzimática sobre o óleo de oliva, porém somente após o acúmulo de certa quantidade de ácido oleico é que a ativação é induzida e a reação é acelerada. O fenômeno da ativação foi verificado ocorrer somente no caso de hidrólise de triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa. Portanto, a ativação parece depender do aumento do estado de emulsificação da mistura de reação pela formação de sais de cálcio com ácidos graxos livres. As lipases dos quatro microrganismos foram inibidas pelo íon  $\text{Fe}^{++}$  ou  $\text{Fe}^{+++}$ .

Em 1973, TSUJISAKA et alii (77) purificaram a lipase de *Geotrichum candidum* (Link) e estudaram algumas de suas propriedades. A purificação foi realizada por fracionamento com sulfato de amônio seguida de fracionamento em coluna de DEAE-Sephadex, gel filtração por Sephadex G-100 e G-200. A composição química da lipase cristalizada indicou a presença de 7.5% de manose como componente principal dentre

os açúcares. Foi detectado também a presença de lipídeo, não sendo esclarecido se a fração lipídica é necessária para a atividade enzimática ou não. A constante de sedimentação da enzima foi estimada em 4.0, o ponto isoelétrico em pH 4.33 e o peso molecular entre 53000 e 55000. A enzima foi mais ativa em valores de pH entre 5.6 e 7.0 e foi estável na faixa de 4.6 a 9.8 durante incubação por 24 horas a 30 °C. A temperatura ótima foi estimada ser 40 °C, e a estabilidade abaixo de 55 °C a pH 5.6 por 15 minutos.

YAMAGUCHI et alii, em 1973 (83), isolaram mais de 750 microrganismos e identificaram como *Chromobacterium viscosum* o melhor produtor de lipase. Essa bactéria produz lipase quando cultivada aerobicamente, a 26 °C por 3 dias em meio composto de : amido solúvel 2%, farinha de soja 2%, óleo de oliva 1% e sais inorgânicos. A lipase de *Chromobacterium viscosum* tem pH ótimo de atividade de 7.0 e temperatura ótima de 65°C. A enzima retém 80% de atividade quando aquecida por 10 minutos à 70°C. A atividade lipolítica foi estimulada por íons  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e inibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  e  $\text{Sn}^{2+}$ . A enzima se mostrou capaz de hidrolisar uma grande variedade de óleos e gorduras naturais como óleo de peixe, manteiga, óleo de oliva, soja, amendoim e algodão.

IWAI et alii, em 1973 (24), estudaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* Link, que em trabalhos anteriores havia demonstrado produzir lipase em meio de cultivo sem adição de lipídeo. Contudo, estudaram o requerimento de lipídeo para produção de lipase pelo microrganismo. Verificou-se que embora o microrganismo crescesse bem em meio composto de “corn steep liquor “ 3%, peptona 5%, glucose 1%, a presença de farelo de arroz era essencial para a produção de lipase. Verificaram posteriormente que a porção lipídica do farelo de arroz era a

responsável pela indução da produção de lipase, podendo ser substituída por óleo de oliva sem prejuízo dos resultados. Adicionaram então ao meio de cultivo óleo de oliva nas concentrações de 1 e 0.5%, ácido oleico 1%, ácido linoleico 1%, ácido caprílico 1%, óleo de algodão 1%, óleo de arroz 1%, óleo de camélia 1% e óleo de rícino 1%. Os resultados mostraram que o ácido oleico foi o mais efetivo na indução de lipase. O requerimento de óleo para produção de lipase foi verificado tanto em meio de cultura sólido como em meio líquido.

JENSEN (30) apresentou em 1974 no Simpósio sobre lipases microbianas, em New Orleans, uma revisão das características da lipase de *Geotrichum candidum*. Foi relatado que *Geotrichum candidum* secreta lipase extracelular que hidrolisa ácidos graxos que contenham ligações cis 9 e cis, cis 9,12 - 18:2, de origem natural ou sintética. A lipase de *G. candidum* é o único exemplo conhecido com especificidade definida por algum ácido graxo. Essa enzima, que tem sido utilizada na determinação da estrutura de glicerídeos em conjunto com a subsequente análise estereoespecífica, separa triglicerídeos enantiômeros. A lipase foi purificada e provavelmente, segundo os autores é uma histidina -serina proteína. A análise de amino-ácidos revelou que esta enzima não possui cisteína e metionina, e portanto não possui pontes S-S. A enzima apresentou atividade ótima na faixa de pH 5.6 - 7.0.

OKUMURA et alii, em 1976 (50), 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 triglicerídeo. Quando dioleína foi utilizada como substrato, estas duas lipases hidrolisam 1,3-dioleína em preferência à 1,2 (2,3) dioleína. As

lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium* hidrolisam todas as ligações éster do triglicerídeo independentemente de sua posição no triglicerídeo.

TSUJISAKA et alii, em 1977 (78), estudaram a reação inversa catalisada pelas lipases a reação de esterificação, utilizando 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 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 solução de enzima e 0.1 g de ácido oleico. As quantidades de glicerídeos sintetizadas pelas lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium* foram muito inferiores (10%) que as quantidades sintetizadas pelas lipases de *A. niger* e *R. delemar* (60%). Para testar o efeito de várias espécies de compostos, como emulsificantes, tampões e proteínas, estes foram adicionados ao sistema de reação na presença de lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium*. Quando foram adicionados caseína, albumina e tampão de pH 6.5 a síntese de glicerídeos aumentou, porém os emulsificantes não apresentaram efeito. A concentração de glicerol na mistura glicerol/ácido graxo interferiu no grau de síntese de glicerídeos. Quando esta concentração era cerca de 80% as lipases foram mais ativas. Com relação às especificidades posicionais na reação de síntese de glicerídeos foram detectados como produtos de reação os seguintes triglicerídeos: 1(3) monoleína e 1,3 dioleína para as enzimas de *A. niger* e *R. delemar* nos estágios iniciais da reação, quando foi utilizado ácido oleico como substrato. Após um longo período de reação pequena quantidade de 1,2 (2,3) dioleína e trioleína foram detectados. Por outro lado, 1(2) e 2-monoleína, 1,2(2,3) e 1,3-dioleína e trioleína foram

detectados como produtos de síntese da reação das lipases de *G. candidum* e *P. cyclopium*.

WATANABE et alii, em 1977 (82), isolaram e identificaram microrganismos produtores de lipase alcalina microbiana. Verificaram as condições para cultivo dos microrganismos visando a produção da enzima e estudaram algumas propriedades da enzima bruta. Duas linhagens isoladas foram identificadas como *Pseudomonas nitroreducens* e *Pseudomonas fragi*. As condições ótimas para cultivo dos microrganismos foram pH inicial de 8.2-8.7 para *P. nitroreducens* e 6.6-7.0 para *P. fragi*, temperatura entre 23-26.5°C e agitação de 300 rpm. A enzima produzida foi precipitada em pH 4.0. As características bioquímicas foram determinadas no extrato bruto enzimático. O pH ótimo para ambas lipases foi encontrado ser 9.5, embora a lipase de *P. nitroreducens* tenha demonstrado alta atividade mesmo a pH 10. As enzimas foram estáveis entre pH 5 e 11. A temperatura ótima para a lipase de *P. fragi* foi de 75 a 80°C. Surfactantes iônicos inibiram as enzimas fortemente. A linhagem de *P. fragi* produziu lipase extracelular e lipase ligada à célula, porém a taxa de produção de lipase extracelular para lipase ligada à célula foi diferente de acordo com as condições de cultivo. A linhagem de *P. nitroreducens* apresentou alta produtividade de lipase alcalina.

PAL et alii, em 1978 (55), estudaram a influência das condições nutricionais e de cultivo na produção de lipase de *Aspergillus niger* em cultura submersa. A temperatura ótima de fermentação foi 35 °C com maior produção de lipase a pH 7.0 num período de incubação de 96 horas. Dentre as fontes de carbono testadas para a produção da enzima, a sacarose induziu crescimento apreciável e alta taxa de formação de enzima, sendo que a concentração ótima foi de 1%. Quando foi utilizado nitrato de amônio como fonte de nitrogênio na concentração de 0.1%, este

produziu o melhor crescimento e produção de lipase. Os sais  $MgSO_4$  e  $FeSO_4$  desempenharam importante papel na produção de lipase, sendo a concentração ótima de 0.1% para  $FeSO_4$  e 0.04% para  $MgSO_4$ . A adição de lipídeos ao meio de fermentação aumentou a produção de lipase. Gordura de manteiga e óleo de oliva causaram o melhor crescimento celular e melhor produção de enzima sendo a concentração ótima de óleo de oliva de 1%.

Foi verificada a influência de diferentes tipos de triglicéridos na indução de lipase produzida por *Mucor hiemalis* por AKTHAR et alii, em 1980 ( 5 ) . Os triglicéridos estudados continham principalmente ácido oleico, ácido erúico ou ácidos graxos saturados de 8 a 16 átomos de carbono. A linhagem de *Mucor hiemalis* estudada produziu lipase extracelular e lipase micelial sendo que ambas apresentaram pH ótimo de 7.0. Com a adição de óleo de oliva ao meio fermentativo, a produção de ambas as lipases foi aumentada. Dentre os triglicéridos estudados o óleo de oliva foi o mais efetivo na indução da formação da enzima. A lipase produzida foi mais efetiva contra óleo de côco do que óleo de oliva ou óleo de mostarda. Verificou-se que a lipase produzida por *Mucor hiemalis* é induzida .

OKUMURA et alii, em 1981 ( 51) estudaram o efeito da ação reversa da lipase na hidrólise de triglicéridos. Foram utilizadas as lipases purificadas de *Aspergillus niger* NRRL-337, *Penicillium cyclopium* ATCC-34613, *Rhizopus delemar* ATCC-34612, *Geotrichum candidum* ATCC-34614. A lipase de *R. delemar* demonstrou ação mais forte de esterificação durante a hidrólise e no entanto a lipase não hidrolisa ligação éster na posição 2 do triglicérido. 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 glicerídeo. 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 rapidamente dentre as quatro lipases. A lipase de *P. cyclopium* tem ação de esterificação na hidrólise, similar à de *R. delemar*.

TANAKA et alii, em 1981 (75), utilizaram lipase de *Rhizopus delemar* para descrever a reação de interesterificação enzimática de óleo de oliva em meio de 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.

LAVAYRE & BARATTI, em 1982 (34), imobilizaram e descreveram as propriedades das lipases pancreática de porco e lipase de *Candida cylindracea*. O suporte utilizado para imobilização foi vidro poroso "spherosil" derivatizado pela introdução de grupos iodopropila. A natureza da interação lipase-suporte confirmou-se ser hidrofóbica. As atividades das lipases imobilizadas comparadas às enzimas solúveis foram dependentes do substrato. A taxa de hidrólise do substrato sintético PNPL ( para nitrofenil laurato) foi aumentada em 23 vezes quando utilizou-se lipase purificada imobilizada. A mudança conformacional que aumenta a atividade de lipase pode ser resultado da interação da enzima com o suporte hidrofóbico, simulando o que ocorre na interface óleo-água.

Quando o substrato tributirina foi utilizado baixa atividade hidrolítica foi observada. Segundo os autores, como o substrato forma gotas a baixa atividade poderia ser resultado da resistência estérica à penetração do substrato na matriz porosa.

TAHOUN et alii, em 1982 (73), estudaram a influência do meio de cultivo com diferentes fontes de carbonos na indução de lipase por *Geotrichum candidum*. O microrganismo foi incubado a 30 °C em meio de cultivo líquido composto de tripticase e minerais como base e contendo como fontes alternativas de carbonos glucose, óleo de oliva, ácido oleico 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 glucose. A atividade de lipase, porém, é maior quando óleo de oliva é adicionado ao meio de cultivo. Tween 80 e ácido oleico inibiram fortemente a produção de lipase extracelular, havendo no entanto aumento na atividade lipolítica da lipase micelial de *G. candidum*.

MACRAE, em 1983 (39), relatou a obtenção de glicerídeos por via enzimática considerando a especificidade da lipase utilizada. Se lipase não específica é usada para catalisar a interesterificação de uma mistura de triglicerídeos o produto obtido será triglicerídeos similares aos obtidos caso a reação fosse realizada quimicamente. Porém se for empregada lipase 1,3 específica, a migração acila será confinada às posições 1,3 do triglicerídeo. A interesterificação catalisada por lipase 1,3 específica do triglicerídeo 1,3- palmitoil-2-monoleína (POP), que é a fração preponderante do óleo de dendê com ácido esteárico, leva à obtenção de 1,3-palmitoil-3,1-estearil-2-monoleína (POS) e 1,3-diestearil-2-monoleína (SOS), que são os dois componentes principais da manteiga de cacau. O autor relata que tem sido possível produzir, através da interesterificação

enzimática, análogo da manteiga de cacau com matéria prima de baixo custo.

JENSEN, em 1983 (31), reviu vários métodos para detecção e determinação de lipases de várias fontes. Para detecção de atividade lipolítica usou diferentes substratos, dentre eles trioleilglicerol, tributirilglicerol, Tweens, etc. As condições do teste foram : faixa de pH entre 7.0 e 9.0, com temperatura ao redor de 30 - 45°C, e emulsões do substrato preparadas com vários emulsificantes. A determinação da atividade lipolítica foi investigada usando vários métodos : a) titulometria ; b) conversão para sais de  $\text{Cu}^{++}$  e colorimetria, c) inclusão de cromóforo na cadeia acil, do glicerol ou substituto, seguido de espectrofotometria ou fluorimetria, d) uso e medida de ácidos graxos radioativos, e) cromatografia gás-líquido, f) métodos imunológicos. A decisão sobre qual método adotar depende , segundo o autor, do objetivo que se almeja e da fonte da enzima. Para a maioria, a titulação direta geralmente é suficiente. A escolha também vai depender do número de amostras a serem analisadas.

JENSEN et alii, em 1983 (32 ), estudaram o tipo de especificidade de lipases, seu controle e sua determinação. A especificidade da lipase, segundo os autores, é controlada pelas propriedades moleculares da enzima, pela estrutura do substrato e por fatores que afetam a ligação entre a enzima e substrato. Os tipos de especificidade conhecidas e esperadas são : I Substrato: a) diferentes modos de lipólise dos glicerídeos pela mesma enzima e, b) por diferentes enzimas da mesma fonte.; II Posicional: a) ésteres primários, b) ésteres secundários, c) todos os tipos de ésteres tipo hidrólise randômica.; III Estereoespecificidade : hidrólise rápida de ésteres primários sn comparados à outros.; IV Combinações dos vários tipos.

POSORSKE, em 1984 ( 61), 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 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, como poder ser realizada à baixas temperaturas, e o tipo de especificidade da enzima. A lipase de *Rhizopus arrhizus* foi usada para esterificar ácidos graxos de cadeia longa e consegue-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.

LINFIELD et alii, em 1984 (35) estudaram a cinética da hidrólise enzimática de óleo de oliva, óleo de côco e banha por lipase de *Candida rugosa*. Esta lipase foi selecionada por não apresentar especificidade e portanto, poder realizar a hidrólise completa de vários substratos. Os experimentos foram realizados a pH 5.4, onde a enzima apresentou maior atividade. O óleo de oliva foi o melhor substrato para enzima de *C. rugosa*, sendo utilizadas as temperaturas de 40 °C para banha e óleo de

oliva e 26 °C para óleo de côco. As diferenças nas taxas de hidrólise podem ser relacionadas às diferenças de estrutura química dos óleos. O óleo de oliva tem alto grau de insaturação (85% de ácido oleico), a banha tem moderado grau de insaturação e o óleo de côco tem baixo.

LINFIELD et alii, em 1985 (36), seguindo o estudo iniciado em 1984 com interação lipídeo-lipase, desenvolveram um método simples para medir atividade lipolítica. A emulsificação do sistema de reação foi realizada com agitação ultrassônica sem a utilização de emulsificantes. Os autores relataram que para os dados de hidrólise enzimática serem reproduzíveis é necessária boa emulsificação inicial, pois após iniciada a hidrólise, os diglicerídeos e monoglicerídeos formados agem como emulsificantes internos do sistema. Basearam-se no fato de que com boa emulsificação inicial, a área de contato substrato-superfície é bem maior sendo assim a obtenção dos dados mais precisa.

GOMI et alii, em 1986 (19), isolaram três tipos de ativadores de lipase ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) do meio de cultura de crescimento de *Saccharomyopsis lipolytica* por cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores descrevem a metodologia de isolamento, estrutura e características dos ativadores. A linhagem de *Saccharomyopsis lipolytica* foi inicialmente caracterizada como *Candida paralipolytica* (1963). O ativador  $\beta$  foi o mais efetivo na ativação da lipase. O ativador  $\beta$  foi identificado como uma mistura de ácido 3,5 - diidroxí- 7- tetradecenóico. Verificaram que o grupo carboxil nos compostos mostraram-se essenciais para a ativação da lipase.

FUGUI et alii, em 1986 (17) estudaram o efeito da lipase de *Candida rugosa* na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão, visando a aplicação de lipases em detergentes para lavanderia. Resultados mostraram que à medida que a concentração de lipase

aumentou, na presença de tensoativos, a remoção do óleo foi melhor. Os agentes tenso ativos mais adequados foram os não iônicos, quando a atividade da lipase é menos afetada. A temperatura ótima de lavagem foi de 37 °C que é a temperatura ótima desta enzima. Os dados mostram que a utilização de lipase de *C. rugosa* na lavagem à 37°C aumenta em 20% a remoção de óleo da fibra de algodão.

KWON & RHEE em 1986 (33) descreveram um método simplificado para determinação de ácidos graxos livres, medindo a atividade de lipases. Este método consiste em : paralisação da reação pela adição de isoctano e HCl 6 N , a camada contendo ácidos graxos livres e o solvente é transferida para um tubo de ensaio com 1 ml do reagente acetato cúprico-piridina, a mistura é homogeneizada por 90 segundos e mede-se a absorbância da fase orgânica a 715 nm. Segundo os autores este método é melhor que da emulsão de óleo/água, sendo mais simples e rápido.

MUDERWA et alii, em 1986 (44), purificaram a lipase de *Rhodotorula pilimanae* Hedrick e Burke e descreveram suas propriedades. Esta linhagem secretou duas enzimas lipolíticas extracelulares com pH ótimo de 4.0 e 7.0, denominadas lipase I e lipase II. Possuem peso molecular de 176800 e 21400 as lipases I e II respectivamente. A temperatura ótima esteve entre 45 a 50 °C para ambas as lipases. EDTA não afetou a atividade enzimática indicando que as duas lipases não dependem de cofator metálico no sítio catalítico. Foram realizados estudos de especificidade pela hidrólise de óleo de colza, por 8 horas de reação .Os produtos obtidos foram 1,2-diglicerídeos e ácidos graxos livres. Estes resultados indicam que estas lipases foram específicas para a posição 1 do triglicerídeo.

NAIR & BONE , em 1987 (47), estudaram a produção de lipase de *Aspergillus foetidus* em meio líquido e com a utilização do microrganismo imobilizado em polímeros naturais como alginato de sódio e agar. Nos ensaios em meio fermentativo líquido, óleo de oliva e sacarose nas concentrações de 2% e 0.5% respectivamente aumentaram a produção de lipase. O pH inicial do meio é de 4.5 caindo para 2.5 com a produção de lipase pelo microrganismo; foi obtida produção máxima de enzima com agitação a 500 rpm. A imobilização não obteve êxito pois houve desintegração do alginato e do agar sendo observado baixo nível de lipase produzida. Os autores levantaram a hipótese do microrganismo ter consumido estes polissacarídeos como fonte de nutrição para seu crescimento.

SOHN et alii, em 1987 (69), estudaram o mecanismo de desativação da lipase de *Candida rugosa*. Interações hidrofóbicas induzidas por isoctano influenciaram a fase inicial de desativação, e aumentaram a conversão para a fase de transição. A desativação térmica da lipase segue uma cinética de segunda ordem à baixa temperatura e aparece uma fase de transição à alta temperatura (55 °C). Isoctano mostrou ser um reagente que rearranja a estrutura hidrofóbica da lipase. A enzima pré tratada com isoctano a 5 °C, mostrou na desativação térmica uma cinética bifásica. Isso sugere que o isoctano mudou as interações hidrofóbicas da enzima antes da desativação térmica. Após o tratamento da enzima com uréia, a estrutura da mesma parece ser mais sensível à desnaturação na fase inicial. Os autores verificaram também que a interação entre cargas elétricas foi muito importante para manter a estrutura durante a desativação, especialmente ânions.

BAILLARGEON & SONNET em 1988 (6) modificaram a lipase de *Candida rugosa* através de ligação covalente com polietilenoglicol.

Compararam as propriedades da enzima modificada com a original, verificando que a lipase modificada é 10 vezes mais estável que a lipase original em água, mas menos estável em benzeno. A lipase modificada teve sua seletividade afetada, favorecendo a reação de síntese com o ácido esteárico em detrimento do ácido oleico.

Foi utilizado um sistema combinado de lipases para hidrólise do óleo de soja por PARK et alii, em 1988 (56). A hidrólise de óleo de soja por diferentes lipases foi comparada e verificou-se que lipase de *Rhizopus delemar* (D), lipase de *Rhizopus niveus* (N) e lipase de *Penicillium sp* (G) hidrolisaram óleo de soja nas porcentagens 44, 42 e 7.2 %, respectivamente, após 10 horas de reação, o que representou hidrólise incompleta. Os resultados obtidos quando foi utilizado um sistema de enzimas combinadas (G + N) e lipases (G + D) foram bem diferentes: o grau de hidrólise do óleo de soja estendeu-se para 95-98% após 10 horas de reação.

NISHIO et alii, em 1988 (48), estudaram a síntese de ésteres catalisada por lipase de *Pseudomonas fragi*. Verificaram que esta enzima catalisa a esterificação de glicerol com ácidos graxos de cadeias carbônicas lineares. No entanto, não esterifica glicerol com ácidos graxos de cadeia carbônica ramificada, como por exemplo ácido isovalérico. Ao realizarem experimentos com álcoois, como geraniol, benzil álcool e ciclohexanol, de cadeias carbônicas não lineares, verificaram que a enzima catalisava a reação de esterificação tanto com alcoóis lineares como com alcoóis de cadeia ramificada. Isto mostra que a enzima é substrato-específica por ácidos graxos de cadeias carbônicas lineares. A enzima mostrou ser ainda, específica para as posições 1,3 na síntese de glicerídeos.

MALISZEWSKA & WIEEZOREK, em 1988 (40), isolaram 160 linhagens de microrganismos produtores de lipase extracelular. Grande interesse surgiu pelas linhagens de *Streptomyces sp* que possuíam alta atividade lipolítica. O meio utilizado no isolamento foi Tributirina Agar. A atividade lipolítica foi também confirmada usando óleo de oliva como substrato. A maior produção de lipase foi encontrada em *Streptomyces sp*, *Bacillus sp* e *Pseudomonas fluorescens*. O crescimento da linhagem de *Streptomyces sp* foi inibido por óleo de soja, podendo ser explicado pela especificidade da enzima pela presença de inibidores ou ainda pela presença de agentes germicidas no óleo. A produção enzimática foi fortemente afetada pela idade da cultura.

ANTONIAN em 1988 (3) realizou uma revisão sobre métodos recentes de purificação e determinação da estrutura de lipases de várias fontes. Foi verificado, durante estudos de determinação da estrutura primária de lipases, que a sequência GLY-X-SER-X-GLY é uma região significativa e existente em todas as lipase. Suspeita-se que o resíduo de serina seja essencial na ligação com os substratos lipídicos.

JACOBSEN et alii, em 1989 (26), produziram e caracterizaram múltiplas formas de lipases por *Geotrichum candidum*. A produção máxima de lipase extracelular foi encontrada com 27 horas de incubação. Foi encontrado um alto grau de heterogeneidade das lipases de *G. candidum* por imunoeletroforese, o que indica múltiplas formas de enzimas.

A presença de dois tipos de lipase na lipase comercial de *Candida rugosa* foi relatada por VEERARAGAVAN & GIBBS em 1989 (79). As lipases têm atividades específicas de 145 e 378  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína. Possuem peso molecular de aproximadamente 58000 cada uma. Os pontos isoelétrico são 5.6 e 5.8 respectivamente.

BAILLARGEON et alii, em 1989 (7), estudaram 3 linhagens de *Geotrichum candidum* ( ATCC 34614, NRRL Y 552 e NRRL Y 553) para produção de lipase. Foram examinadas variáveis como composição do meio de cultura, pH, temperatura de incubação, velocidade de agitação e tempo de incubação. Para as 3 linhagens estudadas, a produção de lipase parece ser estimulada pela presença de óleo ou glicerol. A maior atividade lipolítica foi obtida a 30 °C, com 24 horas de incubação a 300 rpm de agitação e pH neutro. A lipase de *G. candidum* NRRL Y-553 mostrou preferência por hidrolisar ésteres de ácido oleico, enquanto as lipases de ATCC 34614 e NRRL Y-552 discriminaram ácido oleico e palmítico.

JACOBSEN et alii, em 1989 (25), estudaram a produção de lipase extracelular e intracelular de *Geotrichum candidum* durante o crescimento do microrganismo. *G. candidum* produziu lipase extracelular em meio de cultivo basal contendo peptona. Com a adição de óleo de oliva ou Tween 80 ao meio de cultivo basal, a produção de lipase extracelular aumentou significativamente. Foi observado que durante a fase inicial de crescimento do microrganismo no meio de cultivo com óleo de oliva, a produção de lipase intracelular foi maior que a extracelular, e uma interrupção na secreção de lipase extracelular foi encontrada. Contudo, a produção total de lipase intracelular durante o crescimento do microrganismo em meio basal com Tween 80 ou óleo de oliva, foi menor que a produção de lipase extracelular. Ensaios de imunodifusão mostraram que a lipase intracelular é imunologicamente idêntica à lipase extracelular purificada.

SUGIHARA et alii, em 1990 (71), realizaram a análise do genoma do microrganismo *Geotrichum candidum* com uma lipase clonada cDNA a fim de provar a existência de 2 genes nos cromossomos do fungo que fossem homólogos ao cDNA. Cada gene seria responsável pela formação de um tipo de lipase. Como esperado, conseguiram identificar dois genes

homólogos e isolaram e purificaram duas lipases (I e II) por cromatografia de interação hidrofóbica. A lipase I é a forma predominante, com mais de 80 % da atividade lipolítica total. As lipases I e II, apesar de terem a mesma composição aminoacídica, possuem a sequência terminal diferente, evidenciando que realmente são duas enzimas codificadas e produzidas separadamente e não um produto de digestão proteolítica de uma só enzima. A lipase I tem 64 kDa, pI 4.3 e lipase II 66 kDa e pI 4.3. As duas lipases possuem essencialmente a mesma atividade específica, especificidade de substrato, pH estabilidade e temperatura ótima, diferindo somente no pH ótimo e estabilidade térmica.

IIZUMI et alii, em 1990 (22) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas sp* KWI-56 que produz lipase extracelular termoestável. Purificaram e caracterizaram a lipase obtida, a fim de investigar a viabilidade de seu uso industrial. A lipase de *Pseudomonas sp* KWI-56, tem termoestabilidade extrema, sendo sua temperatura ótima de atividade 60°C e estável a 60°C por 24 horas e 76% de sua atividade foi conservada após 3 horas a 70°C. Segundo os autores, sob o ponto de vista da termoestabilidade e grau de hidrólise, a lipase de *Pseudomonas sp* KWI-56 é muito adequada para uso na indústria, pelas suas características bioquímicas.

JACOBSEN et alii, em 1990 (27), identificaram que as lipases de *Geotrichum candidum* possuem especificidade diferentes por ácidos graxos, dependendo das condições de crescimento. A linhagem de *G. candidum* estudada mostrou secretar múltiplas formas de lipase quando cultivada em meio sintético com óleo de oliva como fonte de carbono. As enzimas obtidas mostraram ser dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  para a hidrólise máxima do óleo de oliva. A hidrólise do óleo de oliva foi reduzida em 38% sem a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  no meio de reação. Uma

tendência similar foi observada com a adição de glicerol tributirato. O meio reacional parece influenciar na especificidade da enzima, isso pode ser explicado pelo acúmulo de ácidos graxos livres após algum tempo de hidrólise na interface enzima-substrato, impedindo a hidrólise. O papel do  $\text{Ca}^{2+}$  será formar compostos insolúveis com o ácido oleico, prevenindo a inibição da hidrólise. Glicerol tributirato e outros triglicerídeos saturados podem agir como inibidores competitivos da enzima.

PETROVIC et alii, em 1990 (59), testaram o efeito da adição de vários tipos de fonte de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por *Penicillium roqueforti* S-86. A maior quantidade e atividade da enzima foi obtida após 6 dias de incubação a 27 °C, no meio com glucose e frutose. Na adição de gordura de manteiga a atividade foi cem vezes menor do que com glucose. Quando o óleo de oliva foi usado como fonte de carbono, não foi detectada nenhuma atividade lipolítica. A temperatura ótima de atividade foi 30°C e pH ótimo 8.0. Os sais de potássio e sódio acresceram a atividade enzimática na concentração de até 1 mmol/l. Os cátions bivalentes que ativaram a enzima foram os íons  $\text{Mn}^{++}$  e  $\text{Ca}^{++}$ , e  $\text{Fe}^{+++}$  inibiu severamente a enzima.

ESPINOSA et alii, em 1990 (16 ) estudaram a produção de lipase por *Rhizopus delemar* CDBB H-313 e verificaram os efeitos de diferentes carboidratos como fonte de carbono, tendo sido encontrado que na presença de dextrina a produção de lipase foi 1,6 vezes maior que com glucose. Diferentes óleos foram usados como única fonte de carbono e verificou-se que os óleos são importantes tanto para a produção de lipase como para o crescimento do fungo, sendo o girassol o mais efetivo na produção de lipase. A adição de Tween 80 teve um duplo efeito, podendo agir como indutor e agente tenso ativo estimulando a liberação da enzima, aumentando a atividade lipolítica em cerca de 2 vezes.

BAILLARGEON em 1990 (8) purificou e descreveu a especificidade de lipases de *Geotrichum candidum* a partir de um preparado bruto comercial de enzima. Foram isoladas duas enzimas denominadas lipase A e B. A lipase A continha 11,4% de carboidrato, esta lipase mostrou ser estável com 99% de atividade residual após incubação a 30°C por 24 horas. A composição de aminoácidos das lipases A e B é similar.

BAILLARGEON & Mc CARTHY (9) em 1991, em continuação do estudo de 1990, verificaram que a lipase produzida por *G. candidum* é uma mistura complexa de proteínas que variam em peso molecular, pI e especificidade. A lipase de *G. candidum* NRRL Y-553 consiste de 5 espécies glicosiladas com massa molecular que variam de 64 kDa a 57 kDa. A diferenciação na glicosilação produz heterogenicidade entre as espécies. As lipases isoladas são similares em pI e peso molecular à lipase de *G.candidum* ATCC 34614 e à lipase GC-20 comercial AMANO. Contudo, a especificidade das linhagens é variável sendo que ATCC 34614 tem baixa afinidade por ácidos graxos 18:1 e ácidos graxos 16:0, enquanto *G.candidum* Y-553 produz lipases mais específicas por 18:1. As lipases de *G. candidum* NRRL Y-553 podem ser úteis na reestruturação de ácidos graxos insaturados dos triglicerídeos em larga escala na forma bruta sem purificação, segundo os autores.

MUÑOZ et alii, em 1991 (45), procuraram fungos que produzissem alta quantidade de lipase em meio sólido, baixa concentração de proteases e gerassem aroma em produtos de leite. O meio de cultivo foi composto de farelo de trigo (20 g) umidificado com 20 ml de solução composta por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os fungos selecionados foram: *Penicillium candidum*, *Mucor miehei* e *Penicillium camembertii*. O melhor produtor de lipase apresentou baixos níveis de produção de

protease, sugerindo que a atividade proteolítica afeta a estabilidade da enzima lipolítica.

A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada em DEAE-Sephadex A-50 para realizar hidrólise contínua de óleo de oliva usando solvente isoctano e solução aquosa de tampão, em 1991, por YANG & RHEE (84). Neste tipo de reação contínua (sistema difásico) a meia vida operacional da lipase foi estendida e a concentração do substrato foi aumentada, sendo observados os valores de 220 horas, com 20 % de óleo de oliva como substrato. Nesta concentração de substrato o grau de conversão foi de cerca de 90% e a concentração de glicerol 6% indicando que os triglicerídeos foram quase totalmente hidrolisados. A adição de glicerol à solução tampão estendeu a meia vida operacional da enzima imobilizada de 220 horas para 450 horas sem inibição da enzima, agindo como estabilizador efetivo contra desnaturação térmica e contra desnaturação pelo solvente.

PHILIPS & PRETORIUS, em 1991 (60), purificaram e caracterizaram a lipase extracelular de *Galactomyces geotrichum*, um fungo teleomorfo do *Geotrichum candidum* e compararam as características das duas enzimas. O fungo *Galactomyces geotrichum* secretou o máximo de lipase quando cresceu em meio preparado com óleo de oliva num tempo de incubação de 24 a 36 horas. A lipase foi purificada e foi determinada sua estrutura aminoacídica que se mostrou diferente da lipase de *Geotrichum candidum*. A lipase de *G. geotrichum* tem atividade ótima a pH 7.75 a 30°C. A enzima perdeu toda atividade após tratamento a 56°C por 35 minutos. A enzima possui especificidade para ácidos graxos insaturados como a lipase de *G. candidum*. Segundo os autores, a elucidação mais completa da lipase e sua caracterização bioquímica

talvez possam dar uma idéia da evolução entre as duas espécies de microrganismos.

SIDEBOTTOM et alii, em 1991 (67), purificaram e examinaram a especificidade por substrato de quatro lipases de duas linhagens de *Geotrichum candidum*, ATCC 3614 e CMICC 335426. Denominaram lipase I e II ( ATCC 34614) e lipase A e B ( CMICC 335426). As enzimas são monoméricas e têm massas moleculares e pI similares. Lipase I e II têm massa molecular de 50.1 kDa e 55.5 kDa e pI 4.61 e 4.47 respectivamente. Lipases A e B são muito parecidas às lipase I e II com 53.7 kDa e 48.9 kDa, pI 4.71 e 4.50 respectivamente. A lipase B de CMICC 335426 mostrou especificidade remarcada por substratos insaturados com dupla ligação na posição 9, sendo essa especificidade não observada em nenhuma das outras enzimas. Devido à essa não usual especificidade, a lipase B pode ser de grande interesse na indústria.

SUGIHARÁ et alii, em 1991 (72 ), identificaram quatro formas ( I, II, III, IV) da lipase de *Geotrichum candidum* isolada no próprio laboratório. A quarta fração da lipase de *G. candidum* jamais havia sido isolada antes, e mostrou preferência por hidrolisar ésteres na segunda posição do glicerol, característica não constatada em nenhum estudo posterior. Os estudos de especificidade realizados, mostraram que a lipase IV hidrolisa a posição 2 do triglicerídeo duas vezes mais rápido que as posições 1 e 3.

BAILLARGEON et alli, em 1992 (10), estudaram a lipase de *Geotrichum candidum* NRRL Y-553, específica para ácidos graxos cis 9 insaturados, a fim de produzir através de hidrólise, ácidos graxos, mono e diglicerídeos de interesse industrial. Os resultados mostraram que esta lipase pode ser empregada na produção de ácido oleico proveniente de sebo ou misturas de ácidos graxos cis 9 insaturados de óleo de soja. Na

hidrólise de sebo, com 36.2% de conversão, os ácidos graxos produzidos foram 86.4% de insaturados ; com 61.2% de conversão o produto apresentou 71.4% de insaturados.

SHIMADA et alii, em 1992 ( 66) tentaram elucidar o mecanismo pelo qual os triglicerídeos e ácidos graxos induzem a produção de lipase por *Geotrichum candidum*. A linhagem foi cultivada a 27 °C em meio contendo “corn steep liquor”, óleo de soja, trioleína, ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa ( oleico, linoleico, palmítico, mirístico, láurico e cáprico) e ácidos graxos de cadeia longa. Verificou-se que triglicerídeos saturados de cadeia longa não induzem a produção de lipase por *G. candidum*. O trabalho descreve como os ácidos graxos de cadeia longa e seus ésteres induzem a produção de lipase por *G. candidum* e como os genes que codificam a produção de lipase I e II são transcritos na presença de ácido oleico. Os resultados mostram que as lipases I e II são induzidas por ácidos graxos de cadeia longa e seus genes são expressos quando o indutor está presente no meio de cultivo.

CHEN et alii, em 1992 (12), estudaram uma nova linhagem de levedura produtora de lipase. Descreveram sua identificação morfológica e as condições ótimas de fermentação para produção de lipase. Foram isolados 245 microrganismos destes 25 foram selecionados como produtores de lipase sendo o melhor produtor a linhagem identificada como *Trichosporon fermentans* WU-C12.. Foi relatado que embora o gênero *Endomyces* e *Geotrichum* se pareçam morfológicamente e fisiologicamente ao gênero *Trichosporon*, a linhagem WU-C12 pertence ao gênero *Trichosporom* porque não forma hifas aéreas nas placas de agar. O melhor meio de cultivo para a produção de lipase foi composto de “corn steep liquor “ 8%, óleo de oliva 3%, peptona 5%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.1%, pH 5.5, com 4 dias de fermentação .

TAIPA et alii, em 1992 (74), fizeram uma revisão sobre técnicas usadas na separação e purificação de lipases microbianas, de plantas e de mamíferos. Dentre as lipases microbianas, foram descritas as lipases bacterianas ( *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*) as lipases fúngicas ( *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermomyces*). No grupo das lipases de mamíferos foram revisadas as lipases pancreática ( porcina e humana), gástrica ( humana e de coelhos), lingual ( ratos), lipases de tecidos de fígado, tecido adiposo, lipase de lisossomos e do leite. As novas técnicas citadas de purificação aplicadas às lipases são : extração líquido-líquido; sistemas aquosos bifásicos; processos com membranas e imunopurificação. Os autores concluem que os métodos convencionas de purificação de lipases são muito demorados e compostos por muitas fases. Sugerem que fazendo utilização desses métodos recentes os trabalhos se tornariam mais rápidos.

HOU & JOHNSTON (20), em 1992, selecionaram dentre 1229 culturas, 168 bactérias, 119 leveduras, 22 actinomyceos e 6 fungos como produtores de lipase extracelular. A seleção foi realizada em placa de ágar contendo, além do meio de cultura específico para cada gênero, o corante Rhodamina B e óleo que acusam a presença de lipase através de um halo colorido. Estas linhagens pré selecionadas foram agrupadas em 3 categorias de acordo com a atividade lipolítica desenvolvida : bom, moderado, fraco. Os bons produtores têm potencial para serem usados na indústria. Quanto à especificidade posicional, de ácidos graxos e quiral, são necessários mais estudos.

VONDERWULBECKE et alii, em 1992 (81), selecionaram seis lipases por diferentes métodos a fim de determinarem o melhor método de detecção de atividade lipolítica, e assim definirem o que são as lipases no seu modo de ação. Algumas lipases provaram ser muito mais ativas em

alguns substratos artificiais em concentrações onde não eram identificada atividade em outros substratos. Enzimas que normalmente hidrolisam trioleína, sempre hidrolisam p-nitrofenilpalmitato (pNPP), p-nitrofenilbutirato (pNPB), e com uma exceção hidrolisam também dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGR) e s,o,o,- tributiril-1-tioglicerina (TBTG). Por outro lado, a hidrólise em pNPP e pNPB não significa necessariamente hidrólise de trioleína. O grupo sugere que as lipases devem ser classificadas como ester-hidrolases com a capacidade de formar ésteres, e em algumas condições, de reagir sem a presença da interface óleo-água, e que aceitem grupos  $\text{NH}_2$  ou  $\text{SH}$  ao invés de  $\text{OH}$ . A classificação EC para o grupo é útil e importante, quando se trata de estudos fisiológicos ou enzimológicos. No entanto, quando se trata de hidrólise de substratos diferentes, a classificação se torna limitada.

GELUK et alii, em 1992 (18), imobilizaram lipase bruta e purificada de *Candida rugosa* em celulose microcristalina. O valor máximo de absorção da enzima  $0.2 \text{ mg/cm}^2$  foi alcançado em pH próximo ao ponto isoelétrico, 4.2. É um valor baixo talvez em função da superfície heterogênea ou da superestimação da área superficial. Como a lipase mostrou ser uma proteína hidrofóbica, foram conseguidas melhores interações com suportes mais hidrofóbicos que a celulose. A atividade ( $\text{U ml}^{-1}$ ) da lipase bruta adsorvida é similar à preparação da lipase pura adsorvida.

RAPP & BACKHAUS, (62) em 1992, no Instituto GBF, na Alemanha, com o objetivo de aumentar o número de microrganismos produtores de lipase, selecionaram várias linhagens de fungos, leveduras e bactérias dentre 700 linhagens da coleção do instituto. Fungos e bactérias foram incubados em 20 ml de meio de cultivo contendo : 0.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g  $\text{NaNO}_3$ , 3 g extrato de levedura; 30 g

de peptona com 1% de glucose por litro de meio. Os microrganismos foram incubados em agitador a 120 rpm, 27°C, por 72 horas. Um inóculo de 10 ml deste meio foi inoculado em 250 ml de meio contendo 1 % de óleo de oliva e incubado a 30 °C nas mesmas condições. Foi testada a capacidade dessas linhagens de hidrolisar trioleína em Tween 80 agar. Aqueles microrganismos que apresentaram durante o crescimento um halo na placa grande e claro de hidrólise, foram selecionados. Dentre os 34 fungos selecionados o gênero melhor produtor de lipase foi *Rhizopus*, sendo a melhor atividade encontrada na linhagem *R. circinans* com 44 U/ml após 96 horas de crescimento seguido do *R. microsporus* com 21 U/ml. Foram selecionadas ainda 15 leveduras e 21 bactérias. Dentre as leveduras a melhor foi *Rhodotorula rubra* DSM 70825 com 7 U/ml de atividade após 168 horas de crescimento. A melhor bactéria foi *Pseudomonas cepacia* com 16 U/ml de atividade após 96 horas de cultivo.

AKOH et alii, em 1992 (4), estudaram a produção de monoglicerídeos usando lipase G de *Penicillium sp* e lipase GC de *Geotrichum candidum* em hexano. A enzima G esterifica satisfatoriamente em glicerol com ácido oleico ou ácido eicosapentaenóico em hexano. A esterificação a 40°C por 24 horas resultou em 86.3% e 64.3% mol de incorporação de 18:1n-9 e 20:5 n-3, respectivamente. A lipase GC não foi ativa na esterificação nessas condições experimentais. Lipase G foi capaz de incorporar 98.5% mol e 98.1% de 18:1 n-9 em glicerol em 24 horas ou menos a 25°C e 37°C. Foi demonstrado que a lipase G é capaz de esterificar glicerol com ácido graxo de cadeia longa para produzir monoglicerídeos de ácido oleico enriquecido e EPA enriquecido.

PENICK & KNEZ em 1992 (58) estudaram a síntese de éster de gordura por lipase imobilizada 1,3 específica de *Mucor miehei*. O composto 1,2 isopropilideno glicerol produzido pela condensação de

glicerol com acetona foi esterificado com ácido oleico na presença de lipase de *Mucor miehei* a fim de se obter 1,2 isopropilideno-3-oleil glicerol. Os efeitos dos parâmetros como temperatura e pressão e de diferentes relações enzima/substrato foram investigados. A maior conversão de ácido oleico ( 80% ) foi obtida a 55 °C e 0.057 bar, enquanto a melhor relação de lipase / substrato foi de 0.096 g de lipase por grama de mistura de reação. Isto pode ser explicado pelo fato de mais água necessitar ser removida do sistema à baixa pressão, deslocando o equilíbrio da reação no sentido da formação de éster. Foram determinadas as propriedades termodinâmicas da reação à 55 °C e 0.057 bar. A energia de ativação foi de 20.82 kJ/mol; a entropia de ativação de 0.26 kJ/mol e Energia Livre de ativação de 103.32 kJ/mol.

OHRNER et alii, em 1992 (49), desenvolveram um método simples e poderoso para deslocar o equilíbrio na reação de transesterificação catalisada pela lipase imobilizada de *Candida antarctica*. O método consiste na aplicação de pressão reduzida à mistura reacional. Isto é realizado através da presença de um doador de grupos acil, não volátil, que tenha um grupo que possa ser evaporado, como por exemplo o etil octanoato. Portanto, o ponto de ebulição do álcool usado como solvente da reação deve ser maior do que o ponto de ebulição do doador de grupo acil. Nos experimentos observou-se que etil octanoato como doador de grupo acil foi mais eficiente que ésteres de álcoois secundários formados durante a reação. Neste caso a acilação da lipase livre foi feita quase exclusivamente pelo etil octanoato, o que favoreceu a especificidade e cinética da reação.

MONTERO et alii, em 1993 (42), estudaram a imobilização de lipase de *Candida rugosa* em suporte de polipropileno. A enzima foi rapidamente adsorvida no suporte, pois mais de 60% da atividade solúvel

foi diminuída após 1 hora de incubação a temperatura ambiente. A atividade da enzima imobilizada caiu drasticamente com a perda de água do sistema. O pré-tratamento do suporte com solventes orgânicos (glutaraldeído) aumentou a atividade da enzima imobilizada. Para a imobilização da enzima, as melhores condições são obtidas pela proporção enzima/ suporte de 5 para 15 U/mg de suporte em pH 6.5, com força iônica de 0.2M. A lipase imobilizada pode ser reutilizada após 5 horas de reação de hidrólise lavando-se o sistema com isoctano.

RIAUBLANC et alii, em 1993 (63), isolaram uma nova linhagem de *Candida parapsilosis* produtora de lipase. A enzima produzida apresenta peso molecular de 120000 Daltons e atividade ótima à 45°C e pH 6.5. Esta lipase mostrou grande afinidade por ácidos graxos de cadeia longa e particularmente por ácidos graxos polinsaturados. Esta propriedade pode ser usada na produção de ésteres de ácidos graxos poliálcoóis usados como emulsificantes na indústria de alimentos.

EL-SHARKAWY et alii, em 1993 (15), estudaram hidrólise de gordura por lipase de *Saccharomyces cerevisiae* (UI-SACCH) e *Schizosaccharomyces octosporus* (NRRLY-854) e definiram a especificidade das enzimas. Os resultados experimentais mostram que *S. cerevisiae* cataliza a clivagem de ácido palmítico de POP, PPO, OPO, OOP e SSP. Com base nisso, afirmou-se que a lipase de *S. cerevisiae* não é posicionalmente específica mas, ácido palmítico específica. *S. octosporus* cataliza a hidrólise de ácido esteárico de SSO, OOS, SSS e SSP, mas não de OSO. Isso mostra que a lipase de *S. octosporus* é específica para posições 1,3 e ácido esteárico específica.

PASTORE & PARK, em 1993 ( 57 ), estudaram o efeito da proporção molar entre glicerol e ácido oleico no grau de esterificação enzimática para produção de monoleína, utilizando-se lipase de

*Penicillium sp.* Verificaram que a maior porcentagem de esterificação foi encontrada quando a concentração de glicerol foi 63.3 vezes maior que a concentração de ácido oleico no sistema.

SONNET et alii, em 1993 (70), selecionaram reações de esterificação para comparar tres lipases diferentes de *G. candidum*, porque eram esperadas especificidades diferentes das reações de hidrólise. As lipases comparadas eram todas de *G. candidum* sendo duas comerciais: Amano GC-4 e uma oferecida por Biocatalysts Ltd. (BL) e uma produzida por Sonnet et alii denominada NRRL Y-552. Foi comparada a afinidade por ácido oleico e palmítico, na reação de esterificação pelas lipases GC-4, BL e Y-553. Esse par de ácidos graxos foi selecionado, porque a maioria das enzimas de *G. candidum* apresentam boa atividade de esterificação com esses substratos. Os resultados mostram que como esperado a reação de esterificação com os ácidos linoleico e linolênico ocorreu como com ácido oleico, sendo CG-4 a menos ativa.

MOZAFFAR et alii, em 1994 (43), estudaram a atividade da lipase extracelular do fungo *Pythium ultimum* em função das propriedades da emulsão do substrato, tipo e concentração dos surfactantes utilizados na preparação das emulsões. A maior área de superfície do glóbulo da emulsão é função da concentração do surfactante e da estabilidade da emulsão. Os autores verificaram que a emulsão se apresentou mais estável na seguinte ordem dos surfactantes : ácido taurocólico > Triton X 100 > 3-[3- ( cholamidopropil) dimetilamônio ]- 1 - propanosulfato ( CHAPS). A atividade da lipase de *Pythium ultimum* se mostrou dependente tanto do tipo como da concentração do surfactante. Os autores relataram que a atividade da lipase na emulsão preparada com 1 mM de ácido taurocólico foi a mesma que com a emulsão preparada com 8 mM de CHAPS, o que

segundo os autores, sugere que os dois surfactantes podem estimular a atividade da lipase por mecanismos diferentes. Os autores sugerem ainda que a influência do surfactante está relacionada mais à interação da enzima com a interface óleo-água do que na manutenção de uma emulsão estável.

VIRTO et alii (80), em 1994, imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* para hidrolisar gorduras animais. A imobilização foi realizada pela adsorção da enzima em suporte comercial de polipropileno de tamanho entre 200 - 400 um. O período de contato que permitiu maior grau de hidrólise foi de 90 minutos. As condições ótimas de hidrólise foram obtidas com 0.10 kg de enzima por kilograma de gordura, 40°C por 24 horas. A enzima imobilizada pode ser reutilizada repetindo graus de 90% de hidrólise. Os autores testaram quatro substratos: gordura de carne de boi, gordura de porco cozida e não cozida e óleo de oliva para serem hidrolisados pela enzima imobilizada. Destes substratos, excluindo o óleo de oliva que foi considerado substrato padrão, o maior grau de hidrólise foi obtido em gordura de porco cozido (95%) e o menor em gordura de carne de boi (65%). Foi verificado que o suporte pode ser facilmente recuperado e reutilizado por 5 vezes.

HUANG & AKOH (21), em 1994, estudaram a habilidade das lipases imobilizadas IM 60 de *Mucor miehei* e SP 435 de *Candida antarctica* de modificar a composição em ácidos graxos de alguns óleos vegetais pela incorporação de n-3 ácidos graxos polinsaturados. A reação de transesterificação foi realizada em solvente orgânico na presença de ácidos graxos livres e etil ésteres de ácido eicosapentaenóico (EPA) e de ácido docosapentaenóico (DHA) como doadores de grupos acil. Os autores observaram que com EPA como doador acil, IM 60 obteve maior incorporação que SP 435. Contudo, quando etil ésteres de EPA e DHA

foram utilizados como acil doadores, SP 435 obteve maior grau de incorporação de EPA e DHA do que IM 60. Os autores observaram ainda que quando havia no meio de reação ácido graxo livre e IM 60, com a adição de 5 ul de água, a incorporação de EPA ao óleo de soja aumentou em 4.9%. Quando etil éster de EPA foi utilizado como doador acil, 2 ul de água aumentaram a incorporação de EPA em 3.9%. Ao testarem a adição de água no meio de reação com a enzima SP 435 observaram que a adição de até 2 ul de água aumentava a incorporação de EPA, mas ao aumentarem a quantidade de água, a incorporação declinava. Os autores concluem que a atividade catalítica da enzima SP 435 depende de um controle rigoroso da quantidade de água no sistema de reação, para modificação de óleos. De modo geral, a enzima IM 60 apresentou dados mais consistentes nas reações de incorporação de ácidos graxos.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Materiais :**

##### **3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos**

- **Reagentes químicos** : ácidos, bases, sais minerais, solventes, (Merck, Carlo Erba, Riedel ou equivalente)

- **Reagentes específicos** : soro albumina, bisacrilamida, acrilamida, corantes : azul bromofenol, comassie blue, fenolftaleína, goma arábica, ( Reagen e Merck).

- **Ácidos Graxos** : ácido láurico, ácido butírico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido linoleico, Triton X 100 ( isoctil fenil polioxietileno). ( Riedel e Sigma ).

- **Glicerídeos** : 1(3) - monoleína, 1,2 (1,3) - dioleína, trioleína, tributirina, tricaprilina, tricaproína ( SIGMA), óleo de oliva extra virgem, marca comercial.

- **Meios de Cultura:** agar, peptona, extrato de levedura, ( DIFCO), corn steep liquor ( água de maceração de milho)

-**Carboidratos** : glicose, sacarose, rafinose, galactose, lactose, frutose, ( Merck).

- **Enzimas** : Lipase de *Candida rugosa* obtida de Meito Sangyo Company; Lipase de *Geotrichum candidum* obtida no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos; Lipase XX - Enzenco obtida por EDC - Enzyme; Lipases Lipomod AC, RD, PC, obtida por Biocatalysts Ltd.

- **Resina** : DEAE - Sephadex -A- 50, ( trocador Aniônico) Sigma.

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

- **Padrões de Proteína:** Dalton Mark 7 L para gel SDS , SIGMA.  
Contendo 7 proteínas :

1. Albumina Bovina.....	PM 66000 daltons
2. Albumina de Ovo.....	PM 45000 daltons
3. Gliceraldeído 3-P-deidrogenase.....	PM 36000 daltons
4. Anidrase Carbônica Bovina.....	PM 29000 daltons
5. Tripsinogênio de Pâncreas Bovino.....	PM 24000 daltons
6. Inibidor de Tripsina de soja.....	PM 20000 daltons
7. alfa Lactoalbumina leite bovino.....	PM 14200 daltons

### 3.1.2. Equipamentos

- Agitador rotatório New Brunswick Scientific
- Estufas bacteriológicas, Fanem
- Espectrofotômetro Coleman, 295-E
- Espectrofotômetro Beckman DU - 70
- Banhos de água de temperatura controlada, Fanem
- Potenciômetro Digimed TE-902.
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod J-21.
- Coletor de frações Buchler, mod. Fractometer Alpha 200
- Balança Analítica Mettler, mod. H-10
- Câmara refrigeradora, Gilson
- Homogenizador vertical, em hélice Tecnal.
- Fonte PS 500 XT, Tecnal

## 3.2 Métodos

### 3.2.1. Isolamento de Microrganismos

Foram isoladas linhagens de leveduras de amostras de solo de diversas regiões, água, frutas, resíduos industriais etc.. As amostras foram colhidas em sacos plásticos, com espátulas e pipetas esterilizadas, diluídas em 10 ml de água estéril e inoculadas em tubos de ensaio contendo 6 ml de meio Yeast Malt (YM) líquido composto de : 5 g de peptona, 5 g de glucose, 2.5 g de extrato de levedura em 250 ml de água destilada e incubados a 30 °C até crescimento. Uma alçada foi então diluída em 10 ml de água estéril e inoculada em placas de Petri com meio YM agar composto de : 5 g de peptona, 5 g de ágar, 5 g de glucose, 2.5 g de extrato de levedura em 250 ml de água destilada. Após inoculadas as placas foram incubadas a temperatura de 30°C até crescimento satisfatório das colônias. As linhagens isoladas foram mantidas em tubos de ensaio com meio Y.M. e acondicionadas a temperaturas na faixa de 5 a 10 °C .

### 3.2.2. Estudo do meio de cultivo para isolamento e seleção de linhagens produtoras de lipase.

Dentre os diversos meios de cultivo já testados para o isolamento e seleção de linhagens produtoras de lipase foram selecionados dois meios visando adequação da metodologia ao trabalho proposto. Para este estudo foi utilizada uma linhagem de *Candida rugosa* NRRL 1446 comprovadamente produtora de lipase e cujas características estão descritas em vasta literatura.

#### 3.2.2.1. Meio de Cultivo 1.

O meio de cultivo 1 foi composto de : 0.2 % de uréia, 2 % de glicose, 0.6 % de fosfato ácido de potássio, 0.1 % de extrato de levedura, 1.0 % de

óleo de oliva, pH 6.0. Em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultivo, foram inoculadas as linhagens isoladas. Os frascos foram incubados a 30°C, com agitação de 100 r.p.m., por 48 horas.

Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 r.p.m., 10°C, por 15 minutos. No sobrenadante foi medida a atividade lipolítica.

### **3.2.2.2. Meio de Cultivo 2**

O meio de cultivo 2 foi composto de : 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1 % de farinha de trigo, 3 % de extrato de levedura, 0.2 % de nitrato de amônio, pH 5.0. Em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultivo foram inoculadas as linhagens isoladas. Os frascos foram incubados a 30°C, com agitação de 100 r.p.m., por 48 hs.

Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 r.p.m., 10°C, por 15 minutos. No sobrenadante foi medida a atividade lipolítica.

### **3.2.3. Estudo do sistema de reação apropriado para a detecção de atividade lipolítica de leveduras.**

Como são inúmeros os meios reacionais para detecção de atividade lipolítica de enzimas microbianas foram testados alguns sistemas de reação visando a adequação da metodologia ao trabalho ora proposto. Para este estudo foi utilizada uma linhagem *Candida rugosa* NRRL 1446 comprovadamente produtora de lipase.

#### **3.2.3.1. Determinação de atividade lipolítica utilizando-se como emulsificante álcool polivinílico.**

Em Erlenmeyers de 125 ml foram adicionados 2 ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0 e 5 ml de emulsão composta de óleo de oliva e álcool polivinílico 2 % na proporção 1:4 vol/vol. A este sistema foi acrescentado 1 ml do sobrenadante do meio de cultura previamente

centrifugado, sendo incubado em banho maria termostatizado a 37°C, por 30 minutos, com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona:Etanol 1:1 vol/vol e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.3.2. Determinação de atividade lipolítica sem utilização de emulsificante.**

Em Erlenmeyers de 125 ml foram adicionados 4 ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0, 1 g de óleo de oliva, 5 pérolas de vidro e 1 ml de sobrenadante do meio de cultura previamente centrifugado, sendo incubado a 37°C por 30 minutos em banho maria termostatizado, com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona: Etanol 1:1 vol/vol e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.3.3. Determinação de atividade lipolítica utilizando-se Desoxicolato de Sódio como emulsificante.**

Em Erlenmeyers de 125 ml foram adicionados 2 ml de Tampão Fosfato 0.1 M, pH 7.0, 1 ml de solução de CaCl<sub>2</sub>, 0.1 g de desoxicolato de sódio, 0.5 g de óleo de oliva e 1 ml de sobrenadante do meio de cultura previamente centrifugado, sendo incubado em banho maria termostatizado a 37°C por 30 minutos, com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona:Etanol 1:1 vol/vol e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

#### **3.2.3.4. Determinação de atividade lipolítica utilizando-se Goma Arábica.**

Em Erlenmeyers de 125 ml foram adicionados 2 ml de Tampão Fosfato 0.1 M, pH 7.0 e 5 ml de emulsão preparada com 75% de goma arábica 7% e 25% de óleo de oliva vol/vol. A este sistema foi acrescentado 1 ml de sobrenadante do meio de cultura previamente centrifugado, sendo incubado em banho maria termostatizado a 37 °C por 30 minutos, com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona:Etanol 1:1 vol/vol e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto, nas condições descritas.

O cálculo da atividade das enzimas foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oleico.

Para determinação da curva padrão de ácidos graxos livres utilizou-se amostras contendo concentrações de 0.1 a 1.4 g de ácido oleico, 5ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0, as quais foram colocadas em frascos de 250 ml, com pérolas de vidro, para melhor homogeneização, e foram incubados a 30°C em banho maria termostatizado com agitação constante por 10 minutos. A mistura foi dissolvida com 15 ml de solução de Acetona:Etanol 1:1 vol/vol e titulada contra solução de NaOH 0.05 N usando-se fenolftaleína como indicador.

#### **3.2.4. Seleção de linhagens produtoras de lipase**

As linhagens de nº 212, 334, 559, 566 e 588 pré-selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultivo composto de : 1.5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 0.3% de extrato de levedura, 0.2% de nitrato de amônio, pH 5.0. Os frascos foram incubados a 30 °C com agitação de 100 rpm por 24, 48 e 72 horas.

Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 rpm a temperatura de 10 °C, por 15 minutos. No sobrenadante foi medida a atividade lipolítica como descrito no item 3.2.8.

### **3.2.5 Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica da linhagem nº 212, e conservação da cultura.**

O microrganismo em estudo foi identificado como *Geotrichum sp.* de acordo com as características morfológicas e fisiológicas por Barnett et alii (11), Itsuka & Koto (23), Onions et alii (52).

Para a manutenção da cultura, a linhagem foi cultivada em meio Yeast Malt (YM). Após incubação por 48 horas a 30 °C, adicionou-se vaselina líquida estéril aos tubos de cultivo. A cultura foi conservada a 5°C.

### **3.2.6. Estudo de Parâmetros para a Produção de Lipase pela linhagem nº 212, selecionada como melhor produtora.**

#### **3.2.6.1. Seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por *Geotrichum sp.***

##### **3.2.6.1.1. Meio de Cultivo A**

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultura composto de : 0.45 % de uréia; 0.30 % de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0.30 %  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 0.15 % ácido cítrico; 1.5 % de óleo de oliva emulsificado com goma arábica 7%, foram inoculados com a linhagem nº-212. Os frascos foram incubados a 30 °C, com agitação de 100 rpm, por 24, 48, 72 e 120 horas.

Após o desenvolvimento da cultura os meios foram centrifugados a 10000 rpm, a temperatura de 10°C, por 15 min. A atividade lipolítica no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.2.8.

##### **3.2.6.1.2. Meio de Cultivo B**

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultura composto de : 5% peptona; 2% óleo de oliva; 0.1%  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0.1%

$K_2HPO_4$  e 0.1% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  foram inoculados com a linhagem nº 212.

Os frascos foram incubados a 30 °C, com agitação de 100 rpm por 24, 48, 72 e 120 horas. Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 rpm, a temperatura de 10 °C por 15 min. A atividade lipolítica no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.2.8.

#### **3.2.6.1.3. Meio de Cultivo C**

Foi denominado meio C o meio de cultivo composto de 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 3% de extrato de levedura, 0.2% de nitrato de amônio, pH 5.0, descrito no item 3.2.2.2. Foram preparados 15 ml do meio C em frascos Erlenmeyer de 50 ml e inoculados com a linhagem nº 212. Os frascos foram incubados a 30 °C, com agitação de 100 rpm por 24, 48, 72 e 120 hs. Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 rpm, a temperatura de 10 °C por 15 min. A atividade lipolítica no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.2.8.

#### **3.2.6.1.4. Meio D ( Fermentação sólida)**

Em frascos Erlenmeyer de 500 ml foram adicionados 20 g do meio de cultura composto de farelo de trigo e  $H_2O$  na proporção 1:1 em massa. Os frascos foram esterilizados a 121 °C 1 atm de pressão por 15 min.

Os frascos foram inoculados com a linhagem nº-212 e incubados a 30 °C por 24, 48, 72, 120 hs para o desenvolvimento da cultura.

Após o desenvolvimento o meio foi triturado com 100 ml de  $H_2O$  destilada. Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente por 1 hora, a mistura foi filtrada e o extrato foi denominado extrato enzimático bruto com o qual determinou-se a atividade lipolítica de acordo com as condições descritas no item 3.2.8.

### **3.2.6.2. Estudo do efeito da incorporação de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por *Geotrichum sp.***

Para este experimento foi utilizado um meio de cultivo composto de 5% “corn steep liquor” e 0.5% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com ou sem a adição de 1% dos compostos testados como fonte de carbono: ácido láurico, ácido palmítico, ácido oleico, óleo de girassol, óleo de coco, óleo de mamona, glicerol, óleo oliva.

Frascos Erlenmeyer de 50 ml , contendo 15 ml de meio de cultivo, foram inoculados com a linhagem nº 212. Os frascos foram incubados a 30°C, com agitação de 100 rpm, por 48 horas.

Após o desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados a 10000 rpm, a temperatura de 10 °C, por 15 minutos. A atividade lipolítica no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.2.8.

### **3.2.6.3. Efeito da Temperatura de Fermentação na Produção de Lipase por *Geotrichum sp.***

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultivo composto de 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1% farinha de trigo, 0.2% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 3% de extrato de levedura , foram inoculados com 0.5 ml de suspensão de inóculo da linhagem nº 212. Os frascos foram incubados a temperaturas de 25 °C, 30 °C, 35 °C e 40 °C, com agitação de 100 rpm por 48 horas.

Após o tempo de fermentação, os meios foram centrifugados a 10000 rpm, a temperatura de 10 °C , por 15 minutos. A atividade lipolítica no sobrenadante foi determinada como descrito no item 3.2.8.

### **3.2.6.4. Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase por *Geotrichum sp.***

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultivo composto de 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1% farinha de trigo, 0.2% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 3% de extrato de levedura, foram inoculados com 0.5 ml de suspensão de inóculo da linhagem nº 212. Os frascos foram incubados a 30 °C em agitador a 100 rpm e retirados a cada 24 horas.

A atividade de lipase foi determinada no sobrenadante após centrifugação do meio de cultura a 10000 rpm, por 15 minutos a 10 °C, como descrito no item 3.2.8.

### **3.2.7. Produção de enzima bruta**

Frascos Erlenmeyer de 50 ml contendo 15 ml de meio de cultura composto de 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1% de farelo de trigo, 0.2% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e 3% de extrato de levedura, previamente esterilizados por 15 min a 121°C com 1 atm de pressão, foram inoculados com 0.5 ml suspensão do inóculo da linhagem n° 212.

Os frascos foram incubados por 48 horas em shaker a temperatura de 30°C, com agitação de 200 rpm.

Após o tempo de fermentação os meios foram centrifugados a 4000 rpm por 25 minutos e o precipitado foi descartado. No sobrenadante foi determinada a atividade enzimática.

A concentração de proteína do sobrenadante do caldo de cultivo foi determinada de acordo com LOWRY (37) utilizando-se albumina de soro bovino como proteína padrão.

### **3.2.8. Determinação da Atividade enzimática de Lipase**

A atividade enzimática foi determinada em frascos Erlenmeyer de 125 ml tomando-se 5 ml de emulsão preparada com 75% de goma arábica a 7% e 25% de óleo de oliva extra virgem. Adicionou-se 2 ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0 ; 1 ml de solução enzimática foi acrescentado e os frascos foram incubados a 37°C por 30 minutos em banho termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto.

A reação foi paralisada por adição de 15 ml de Acetona:Etanol na proporção de 1:1 e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto nas condições do teste.

### **3.2.9. Fracionamento com sulfato de amônio**

Para 800 ml de extrato aquoso enzimático obtido de acordo com o item 3.2.7 foi adicionado sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 80% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu por 24 horas a 5°C, para precipitação da enzima.

A mistura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos com refrigeração. O precipitado foi dialisado contra água deionizada por 24 horas a 5°C para retirada do sal e após dialisado contra Tampão Fosfato 0.05 M pH 7.0 por 24 horas a 5°C.

Após a diálise foi determinada a atividade enzimática. A fração proteica obtida foi congelada a -18°C e em seguida liofilizada. O material liofilizado foi triturado em almofariz, pulverizado e denominado preparação semi purificada.

### **3.2.10. Caracterização Bioquímica da lipase bruta ( semi purificada)**

#### **3.2.10.1 Efeito do pH**

Em geral as enzimas são ativas em uma faixa limitada de pH, definindo-se um pH ótimo de atividade. O pH pode também interferir com a estabilidade da enzima estabelecendo condições para utilização destas em processos industriais.

Visando conhecer tão importantes parâmetros foram determinados o pH ótimo e o pH de estabilidade da lipase bruta.

#### **3.2.10.1.1 Determinação do pH ótimo**

Foram preparadas soluções Tampão nos seguintes valores : Tampão Acetato 0.1 M pH 3.7, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.6. Tampão Fosfato 0.1 M pH 6.0, 6.6, 7.4 e 8.0. Tampão Borato 0.1 M pH 8.0, 8.6 e 8.8.

Em Erlenmeyers de 125 ml foram preparados sistemas de reação compostos de 5 ml de emulsão de goma arábica 7% e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente, 2 ml de cada solução tampão descrito acima e 1 ml da solução enzimática contendo 2.5 unidades de

atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos em banho termostatizado com 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona : Etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

#### **3.2.10.1.2 Determinação do pH de Estabilidade**

A enzima foi misturada com 2 ml de cada solução Tampão preparadas nos seguintes valores de pH : Tampão Acetato 0.1 M pH 3.7, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.6. Tampão Fosfato 0.1 M pH 6.0, 6.6, 7.4 e 8.0. Tampão Borato 0.1 M pH 8.0, 8.6 e 8.8 por 24 horas a temperatura ambiente (25°C). Após o tratamento 1 ml da solução enzimática contendo 2.5 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ) foi acrescentado a frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 5 ml de emulsão goma arábica 7% / óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente e determinada a atividade enzimática remanescente de acordo com o item 3.2.8.

#### **3.2.10.2 Efeito da Temperatura**

##### **3.2.10.2.1 Determinação da temperatura ótima**

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 3.2.8. utilizando-se as temperaturas de incubação de 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C e 60°C .

##### **3.2.10.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima**

A solução de enzima bruta com 2.5 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ) foi tratada a temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e banho maria em ebulição por uma hora. Após o tratamento térmico a atividade enzimática remanescente foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

### 3.2.11 Hidrólise de óleo de oliva por lipase bruta de *Geotrichum sp.*

O acompanhamento da reação de hidrólise de óleo de oliva extra virgem foi realizado incubando-se a 37°C o sistema de reação composto de 5 ml de emulsão goma arábica 7% e óleo de oliva na proporção de 75%: 25% respectivamente, 2 ml de solução Tampão 0.1M pH 7.0 e 1 ml de enzima bruta com 10 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ) por tempo de reação variável de: 6 minutos, 9 min., 15 min., 30 min., 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona/Etanol (1:1) os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N , sendo calculada a porcentagem de hidrólise considerando-se o n° de saponificação.

$$\% \text{ Hidrólise} = \text{ml NaOH } 0.05 \text{ N} / \text{n}^\circ \text{ de saponificação} \times 100$$

Foram retiradas amostras dos sistemas e reação para análise através de cromatografia em Camada Delgada.

### 3.2.12. Hidrólise de vários substratos por lipase bruta de *Geotrichum sp.*

Em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 2 ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0 e 5 ml de emulsão preparada com 75% de goma arábica 7% e 25 % dos substratos : óleo de girassol, óleo de arroz, óleo de milho, óleo de soja e gordura de porco, foram adicionados 1ml de enzima bruta contendo 5 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ). Os frascos foram incubados a 37°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto, por 1,2,6,12, e 24 horas de reação.

A reação foi paralisada por adição de 15 ml de Acetona:Etanol na proporção de 1:1 e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Foram coletadas amostras do sistema de reação para análise através cromatografia em Camada Delgada.

### **3.2.13. Determinação do número de Saponificação**

A 5 ml de emulsão de goma arábica 7% e óleo de oliva (75%/25%) foram acrescentados 2 ml de solução tampão 0.05N pH 7.0 e 25 ml de solução 5.6 % de KOH alcoólica.

A mistura de reação foi aquecida a temperatura de ebulição por 40 minutos e após este período a solução de KOH remanescente foi titulada contra solução de HCl 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.14. Cromatografia em Camada Delgada (T L C ) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva e outros substratos por ação de lipase de *Geotrichum sp.***

A cromatografia em Camada Delgada foi realizada preparando-se placas de Silica gel com 45 g de Sílica gel G-60 e 90 ml de solução de ácido bórico 0.3 M . A mistura foi aplicada em placas de vidro 20 X 20 cm com 2 mm de espessura, com aplicador Desaga. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia foi éter de petróleo: éter etílico : ácido fórmico na proporção 210:90:0.4 (v/v) respectivamente, a temperatura de 25°C. O tempo de desenvolvimento da cromatografia foi de aproximadamente 35 minutos. Foram utilizados como padrões trioleína, 1,2 (1,3) - dioleína, 1 (3)- monoleína na concentração de 1% em solução Acetona:Etanol 1:1.

A revelação do cromatograma foi feita incubando-se a placa de cromatografia em câmara de iôdo sublimado, a 110°C por 45 minutos. (4)

### **3.2.15. Influência de sais minerais na atividade da enzima bruta.**

A influência de sais minerais na atividade enzimática sobre o substrato óleo de oliva emulsificado com goma arábica 7%, foi verificada dentro da faixa de concentração de sais minerais onde não houvesse interferência com o método de determinação de atividade. Utilizou-se o sistema de reação descrito em 3.2.8, com enzima bruta contendo 10 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ), acrescido de 1 ml das seguintes soluções, perfazendo uma concentração final das mesmas na mistura de reação de 1mM : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>,

CuSO<sub>4</sub>, KCl, LiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>. As misturas de reação foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução 1:1 de Acetona:Etanol, os ácidos graxos liberados foram titulados contra NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.16. Influência de inibidores da lipase bruta de *Geotrichum sp.***

A influência de inibidores foi verificada semelhantemente à influência de sais minerais na atividade enzimática. O sistema de reação foi constituído como descrito em 3.2.8. acrescentado de 1 ml de solução de um dos seguintes compostos foi acrescentado ao sistema de reação : p-cloromercuribenzoato, cisteína, iodoacetamida, bissulfito de sódio e mercaptoetanol na concentração necessária para perfazer 1 e 5 mM em relação ao volume total da mistura de reação e 1 ml de solução enzimática bruta contendo 10 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ). As misturas de reação foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução de Acetona: Etanol na proporção 1:1 e os ácidos graxos liberados foram titulados contra NaOH 0.05N com fenolftaleína como indicador.

### **3.2.17. Estudo da especificidade da enzima bruta de *Geotrichum sp.***

Em Erlenmeyers de 50 ml foram adicionados 0.1 ml de solução de goma arábica 7%, 1 ml de Tampão Fosfato 0.1 M pH 7.0, 1ml de solução enzimática bruta contendo 5 unidades de atividade e 10 mg de um dos seguintes substratos: Monoleína, Dioleína e Trioleína ( SIGMA) . Os frascos foram incubados em banho maria termostaticado a 37°C por 2 horas, com agitação de 130 oscilações por minuto. Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 5ml de solução de Acetona: Etanol 1 : 1 e os ácidos graxos liberados titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.18 Purificação da lipase de *Geotrichum sp.***

#### **3.2.18.1 Fracionamento com Sulfato de Amônio**

O fracionamento da lipase com sulfato de amônio foi realizado como descrito no item 3.2.9.

#### **3.2.18.2 Cromatografia de Troca Iônica da lipase em coluna de DEAE-Sephadex A-50**

Dois gramas de enzima bruta liofilizada contendo 1000 unidades de atividade total (  $\mu$ moles ácido graxo/min ) obtida segundo o item 3.2.9 foram dissolvidas em 40 ml de água e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos. O precipitado foi desprezado e do sobrenadante foram tomados 37.5 ml e aplicados em cromatografia de troca iônica utilizando-se coluna de vidro contendo a resina de DEAE-Sephadex A-50 ( 2.6 x 53 cm ) equilibrada com tampão acetato 0.05 M pH 5.0. As frações proteicas foram eluídas da coluna pela aplicação de 500 ml de tampão acetato 0.05 M pH 5.0 contendo concentrações de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 e 0.8 M de NaCl consecutivamente. Frações de 10 ml foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações Buchler mod. alpha 200. O curso da eluição das proteínas da coluna foi acompanhado pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro Beckman DU-70. A atividade das frações foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

As frações de número 115 a 137 contendo atividade de lipase foram reunidas num total de 200 ml. Essa solução enzimática foi dialisada contra água destilada por 24 horas a 5 °C e posteriormente concentrada com polietilenoglicol por 48 horas. Foi determinada a atividade como no item 3.2.8

### **3.2.19. Caracterização bioquímica da lipase purificada de *Geotrichum sp.***

#### **3.2.19.1 Efeito do pH**

##### **3.2.19.1.1 Determinação do pH ótimo de atividade**

Foram preparadas soluções tampão nas seguintes concentrações : Tampão Acetato 0.1 M pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 e 5.5. Tampão Fosfato 0.1 M pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, e 8.0. Tampão Borato 0.1 M pH 8.0, 8.5 e 9.0. Tampão Tris-HCl 0.1M pH 9.0, 9.5 e 10.

Em Erlenmeyers de 125 ml foram preparados sistemas de reação compostos de 5 ml de emulsão de goma arábica 7% e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente, 2 ml de cada solução tampão descrito acima e 1 ml de solução enzimática contendo 164 ug proteína/ml (187 unidades de atividade específica /ml). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos em banho termostático com 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona : Etanol (1:1) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

##### **3.2.19.1.2 Determinação do pH de Estabilidade**

Dois ml da solução enzimática contendo 164 ug proteína/ml (187 unidades de atividade específica/ ml ) foram misturados com 2 ml de cada solução tampão descrita no item anterior por 24 horas a temperatura ambiente (25°C). Após o tratamento 1 ml da solução enzimática foi acrescentado a frascos Erlenmeyers de 125 ml contendo 5 ml de emulsão goma arábica 7% e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente e determinada a atividade enzimática remanescente de acordo com o item 3.2.8.

### **3.2.19.2 Efeito da Temperatura**

#### **3.2.19.2.1 Determinação da temperatura ótima de atividade**

A atividade enzimática da lipase purificada, em diferentes temperaturas, foi testada como descrito no item 3.2.8. utilizando-se as temperaturas de incubação de 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C e 60°C.

#### **3.2.19.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima**

Dois ml da solução enzimática contendo 164 ug de proteína/ ml (187 unidades de atividade específica / ml) foram tratadas a temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 70°C, 90°C e banho maria em ebulição por uma hora. Após o tratamento térmico a atividade enzimática remanescente foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

#### **3.2.20. Influência de sais minerais na atividade da enzima purificada de *Geotrichum sp.***

A influência de sais minerais na atividade enzimática sobre o substrato óleo de oliva emulsificado com goma arábica, foi verificada dentro da faixa de concentração de sais minerais onde não houvesse interferência com o método de determinação de atividade. Utilizou-se o sistema de reação descrito em 3.2.8, com enzima a purificada na concentração de 164 ug de proteína /ml (187 unidades de atividade específica / ml), acrescido de 1 ml das seguintes soluções, perfazendo uma concentração final das mesmas na mistura de reação de 1mM : Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, KCl, LiSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub> e ZnSO<sub>4</sub>. As misturas de reação foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução 1:1 de Acetona:Etanol, os ácidos graxos liberados foram titulados contra NaOH 0.05 N utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.21. Influência de inibidores da lipase purificada de *Geotrichum sp.***

A influência de inibidores foi verificada semelhantemente à influência de sais minerais na atividade enzimática. O sistema de reação foi constituído como descrito em 3.2.8. acrescido de 1 ml de solução de um dos seguintes compostos : p- cloromercuribenzoato, cisteína, iodoacetamida, bissulfito de sódio e mercaptoetanol na concentração necessária para perfazer 1 e 5 mM em relação ao volume total da mistura de reação e 1 ml de solução enzimática purificada na concentração de 164 ug de proteína /ml (187 unidades de atividade específica / ml). As misturas de reação foram incubadas a 37°C por 30 minutos.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução de Acetona: Etanol na proporção 1:1 e os ácidos graxos liberados foram titulados contra NaOH 0.05N com fenolftaleína como indicador.

### **3.2.22. Hidrólise do óleo de oliva por ação da lipase purificada de *Geotrichum sp.***

O acompanhamento da reação de hidrólise de óleo de oliva extra virgem foi realizado incubando-se a 37°C o sistema de reação composto de 5 ml de emulsão goma arábica 7% e óleo de oliva na proporção de 75%: 25% respectivamente, 2 ml de solução Tampão fosfato 0.1M pH 7.0 e 1 ml de enzima purificada na concentração de 164 ug de proteína / ml (187 unidades de atividade específica / ml) por tempo de reação variável de: 6 minutos, 9 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de solução Acetona/Etanol (1:1) os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0.05 N , sendo calculada a porcentagem de hidrólise.

### **3.2.23. Determinação do teor de açúcares totais na lipase de *Geotrichum sp.***

O conteúdo de açúcares totais presentes na lipase de *Geotrichum sp* foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico, de acordo com Dubois et alii ( 14 ).

### **3.2.24. Estudo da reação de Esterificação por lipase de *Geotrichum sp.***

#### **3.2.24.1 Efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática**

Em bequer de 250 ml contendo quantidades de ácido oleico e glicerol de forma a fornecer uma proporção molar de 30, 40 e 60 entre glicerol e ácido oleico, foram acrescentados 100 mg de enzima bruta perfazendo um total de 50 unidades de atividade, para 126 g de substrato. O frasco foi incubado a 40°C em banho termostatizado e homogenizado com agitação de 500 rpm por 0, 15, 30, 60, 90 e 180 minutos de reação.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de Acetona:Etanol na proporção de 1:1 e o ácido oleico remanescente foi titulado contra solução de NaOH 0.05 N, usando-se fenolftaleína como indicador.

A porcentagem de esterificação foi calculada em relação ao teor de ácido oleico presente no tempo zero de reação e o teor de ácido oleico remanescente após o tempo de reação.

#### **3.2.24.2. Efeito da temperatura no grau de esterificação enzimática.**

Em bequer de 250 ml contendo 10 g de ácido oleico e 116 g de glicerol, de forma a fornecer uma relação molar de 60 entre glicerol e ácido oleico, foram acrescentados 100 mg de enzima bruta perfazendo um total de 50 unidades de atividade, para aproximadamente 126 g de substrato. Os frascos foram incubados a 25°C, 30°C, 40°C e 50°C em banho termostatizado com agitação de 500 rpm por 0, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, 8, 24 e 48 horas de reação.

A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de Acetona:Etanol na proporção de 1:1 e o ácido oleico remanescente foi titulado contra solução de NaOH 0.05 N, usando-se fenolftaleína como indicador.

A porcentagem de esterificação foi calculada em relação ao teor de ácido oleico presente no tempo zero de reação e o teor de ácido oleico remanescente após tempo de reação.

### 3.2.24.3. Efeito da concentração de lipase no grau de esterificação enzimática

Em bequer de 250 ml contendo 10 g de ácido oleico e 116 g de glicerol de forma a fornecer uma relação molar de 60 entre glicerol e ácido oleico, foi acrescentada lipase bruta nas concentrações de : 20, 50, 100, 200 e 300 mg, 10, 25, 50, 100 e 150 unidades de atividade respectivamente, para aproximadamente 126 g de substrato. O bequer foi incubado a 40 °C em banho termostaticado e homogenizado com homogenizador de hélice por 0, 1/4, 1/2, 1, 2, 4, e 6 horas de reação. A reação foi paralisada pela adição de 15 ml de Acetona : Etanol na proporção de 1:1 e o ácido oleico remanescente foi titulado contra solução de NaOH 0.05 N usando-se fenolftaleína como indicador. A porcentagem de esterificação foi calculada em relação ao teor de ácido oleico presente no tempo zero de reação e o teor de ácido oleico remanescente após o tempo de reação.

### 3.2.25. Determinação do peso Molecular por Eletroforese Vertical em gel SDS - Poliacrilamida

A análise eletroforética da enzima lipolítica de *Geotrichum sp.* foi realizada de acordo com Shapiro, 1967 com eventuais modificações para determinação do peso molecular da enzima.

#### 3.2.25.1. Tratamento das amostras proteicas

Um volume de solução de lipase de *Geotrichum sp* contendo **164 ug proteína/ ml** de proteína foi misturada em partes iguais com solução tampão para tratamento da amostra contendo : 2.5 ml de tampão Tris pH 6.8, 4.0 ml de solução 10% de SDS, 2.0 ml de glicerol, 1 ml de 2-mercaptoetanol e 1.0 ml de água. A mistura foi aquecida em banho maria à ebulição por 3 minutos.

### 3.2.25.2. Preparo da placa para eletroforese vertical

As placas para eletroforese foram montadas utilizando-se um espaçador de 1,5 mm de espessura e vedadas com solução de agarose 2 % para evitar vazamento do gel.

#### Preparo do gel de separação

Em Erlenmeyer de 125 ml foram misturadas vagarosamente 20 ml de solução acrilamida-bisacrilamida composta por 29.2 g de acrilamida e 0.8 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada, 15 ml de tampão Tris pH 8.8, 24,1 ml de água destilada, 0.4 ml de solução 10% SDS. A seguir adicionou-se 300 µl de solução de persulfato de amônio 10 % e 20 µl de TEMED ( tetra metil etileno diamino) .Misturou-se cuidadosamente, evitando a formação de bolhas. A solução foi despejada entre as placas previamente preparadas até atingir cerca de 2.0 cm abaixo do topo superior. A seguir a superfície da solução foi coberta cuidadosamente com água destilada. A placa ficou em repouso por 30 minutos, até a completa polimerização do gel ( a interface líquida torna-se visível). Após a polimerização, a água destilada foi removida com papel absorvente.

#### Preparo do gel superior

Em frasco de 50 ml foram misturadas cuidadosamente 2.66 ml de solução acrilamida-bisacrilamida composta por 29.2 g de acrilamida e 0.8 g de bisacrilamida em 100 ml de água destilada, 5.0 ml de tampão Tris pH 6.8, 12.2. ml de água destilada, 0.2 ml de solução SDS 10 % . A seguir foram adicionados 100 uL de solução de persulfato de amônio 10%, 10 ul de TEMED e misturados cuidadosamente, evitando a formação de bolhas. A placa foi completada com gel do topo e o pente foi inserido evitando-se a formação de bolhas. A placa ficou em repouso aproximadamente 30 minutos, até a completa polimerização do gel. O pente e o separador inferior foram removidos cuidadosamente para não destruir os orifícios superiores e a base do gel. Posteriormente os orifícios foram preenchidos com tampão de reservatório Tris-Glicina.

### 3.2.25.3. Corrida da Amostra

As amostras preparadas foram colocadas em cada orifício do gel superior da placa em quantidades de 15 ul, com o auxílio de uma microseringa de 50 ul. A cuba para eletroforese vertical contendo a placa

foi conectada à Fonte PS 500 XT . A corrida eletroforética foi realizada com a corrente de 70 V. O tempo de corrida foi aproximadamente de 4 horas.

#### **3.2.25.4. Revelação do gel**

O gel foi cuidadosamente removido das placas e colocado em solução corante composta por 12.5 ml de solução 1% de Comassie Blue R-250, 50 ml de metanol, 10 ml de ácido acético e 100 ml de água. por aproximadamente 8 horas, agitando-se esporadicamente. Após esse tempo o gel foi transferido para solução descorante I composta por 50 ml de metanol, 10 ml de ácido acético e 100 ml de água por 1 hora e depois para a solução descorante II composta por 5 ml de metanol, 7 ml de ácido acético e 100 ml de água até o descoramento total do gel. A placa foi fixada em papel celofane.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Isolamento de microrganismos**

Foram isoladas aproximadamente 700 linhagens de levedura, e testadas quanto à capacidade de hidrolisar óleo de oliva, através da produção de lipase extracelular. Das 700 linhagens estudadas foram pré selecionadas as de número 334, 559, 588, 566 e 212.

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de ácido graxo por minuto de reação nas condições descritas.

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

A ação das lipases pode ocorrer através da clivagem das ligações ésteres dos glicerídeos liberando ácidos graxos, glicerol, monoglicerídeos, diglicerídeos ou ainda através da esterificação e interesterificação de óleos e gorduras, produzindo os glicerídeos desejados.

### **4.2 Estudo do meio de cultura para isolamento e seleção de linhagens produtoras de lipase.**

A linhagem de *Candida rugosa* NRLL 1446 foi utilizada como microrganismo padrão para produção de lipase sendo testada nos meios de cultivo descritos nos itens 3.2.2.1 e 3.2.2.2.

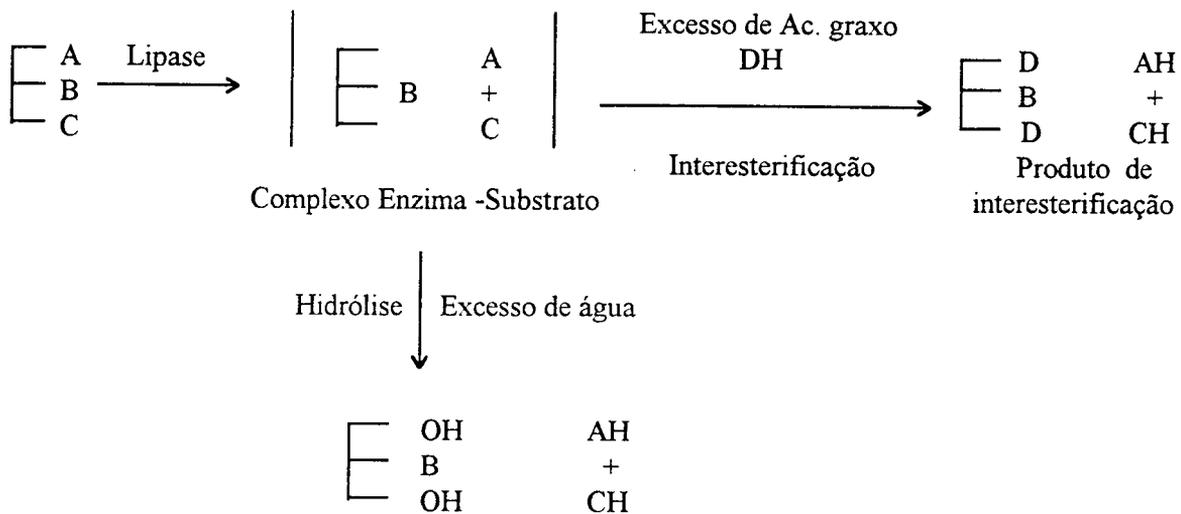
A tabela 01 mostra a atividade lipolítica obtida de acordo com os tempos de incubação de 24, 48 e 72 horas. A determinação de atividade foi realizada de acordo com o item 3.2.8.

Foi verificado que o meio de cultivo 2 mostrou-se mais adequado para a seleção de microrganismos produtores de lipase. O meio de cultivo 2 apresenta maior concentração de nitrogênio orgânico que o meio 1 e não apresenta óleo ou gordura em sua composição.

Nair & Bone (47) estudaram as condições ótimas para produção de lipase por *Aspergillus foetidus* em meio líquido verificando que a presença de óleo de oliva na concentração de 2 % e sacarose 0.5 % no meio de cultura elevou a produção de lipase.

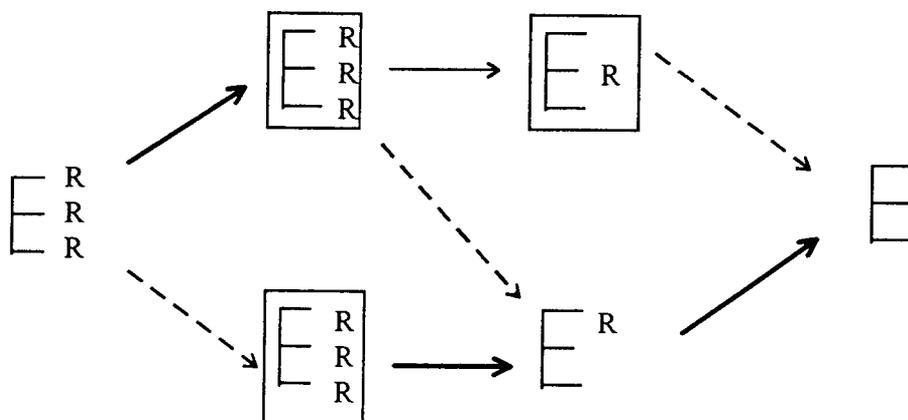
A influência da composição do meio na produção de lipase foi estudada também por Cutchins et alii (13), relatando que a presença de 0.05 % de glucose aumentou a produção de lipase pela levedura

**FIGURA 1 - Representação do modo de ação de Enzimas Lipolíticas**

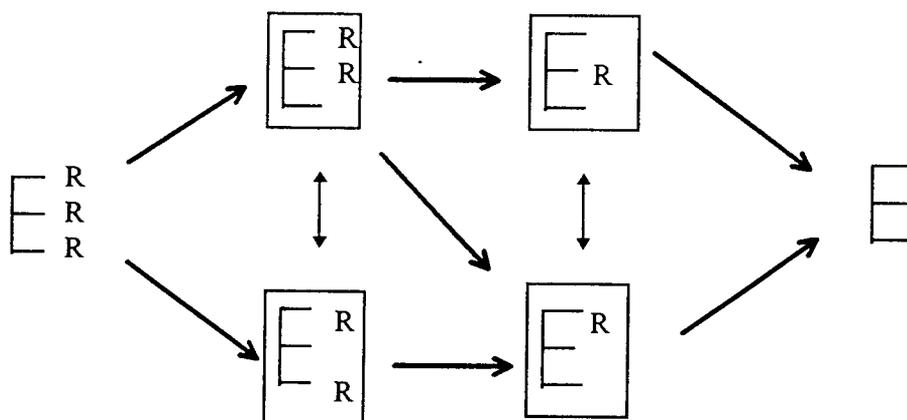


**FIGURA 2 - Sequência das Reações de Hidrólise de Óleos e Gorduras por ação de lipases**

A)



B)



A) Lipase com especificidade posicional

B) Lipase sem especificidade posicional

E glicerol, R: ácido graxo  $\longleftrightarrow$  isomerização espontânea,

$\longrightarrow$  hidrolisado,  $-\ - \longrightarrow$  não hidrolisado

$\square$  Produto acumulado na mistura de reação

**TABELA 1 - Seleção do meio de cultivo para produção de lipase, usando linhagem de *Candida rugosa* NRRL1446**

<b>Meio de Cultivo</b>	<b>Tempo de Fermentação (horas)</b>	<b>Atividade (<math>\mu</math>moles ácido graxo/min/ml)</b>
<b>Meio 1</b>		
	24	0
0.2% uréia		
2.0% glucose	48	1.68
0.6% $\text{KH}_2\text{PO}_4$		
0.2% $\text{K}_2\text{HPO}_4$	72	1.05
0.1% extrato de levedura		
1.0% óleo de oliva		
<b>Meio 2</b>		
	24	1.68
1.5% farinha de soja		
1.0% farinha de trigo	48	3.39
3.0% extrato de levedura		
0.3% $\text{NH}_4\text{NO}_3$	72	0.63

*Mycotorula lipolytica* porém, na presença de óleo de oliva e glicose não houve produção de atividade lipolítica.

### **4.3 Estudo do sistema de reação apropriado para detecção de atividade lipolítica de leveduras.**

Considerando-se que as lipases são enzimas e portanto solúveis em água e que agem sobre substratos não solúveis tais como óleos e gorduras, a interação enzima-substrato deve ocorrer na interface óleo-água. Sendo assim, o estado de emulsificação do substrato é determinante na medida de atividade lipolítica. Para preparar emulsões estáveis, o substrato deve ser líquido e deve-se adicionar emulsificantes, estabilizantes ou ambos.

Dentre os métodos empregados para a determinação da atividade lipolítica foi verificado que, utilizando-se lipase produzida pela linhagem padrão de *Candida rugosa* NRRL 1446, o emprego de goma arábica como agente estabilizante da emulsão de óleo de oliva, dispensando o uso de emulsificante, (31), mostrou-se o mais adequado para medida da atividade lipolítica.

A tabela 02 traz os resultados obtidos neste experimento. É também conhecido que os emulsificantes não iônicos podem aumentar drasticamente as taxas de lipólise catalisadas por enzima. Por outro lado, Linfield et alii (35) estudando as interações lipídeo-lipase de *Candida rugosa*, verificou que a presença de 0.01 % de surfactante não iônico causou forte inibição da ação enzimática com o tempo de reação de 8 horas.

Linfield et alii (36), estudando a interação lipídeo-lipase, desenvolveram um método simplificado para medir atividade lipolítica. Os autores concluem o estudo observando que para se obter dados confiáveis nas medidas, é necessária boa emulsificação inicial, pois após iniciada a hidrólise, os diglicerídeos e monoglicerídeos formados agem como emulsificantes internos do sistema.

### **4.4 Seleção da linhagem melhor produtora de lipase.**

A linhagem número 212 foi selecionada como a melhor produtora de lipase, dentre 05 linhagens preliminarmente selecionadas, apresentando inclusive, atividade superior à padrão *Candida rugosa* NRRL 1446.

As linhagens pré selecionadas número 212, 566, 334, 559 e 588 estão relacionadas na figura 03, na qual se mostra o resultado do estudo

**TABELA 2 - Seleção do método de determinação de atividade lipolítica, usando linhagem de *Candida rugosa* NRRL 1446**

<b>Método</b>	<b>Substrato</b>	<b>Atividade (<math>\mu</math>moles ácido graxo/ min /ml)</b>
Método 3.2.3.1.	Tampão fosfato 0.1N pH 7.0 Emulsão c/ álcool polivinílico e óleo de oliva	3.4
Método 3.2.3.2.	Tampão fosfato 0.1 N pH 7.0 e óleo de oliva	0
Método 3.2.3.3.	Tampão fosfato 0.1 N pH 7.0 Emulsão c/ desoxicolato de sódio e óleo de oliva	0
Método 3.2.3.4.	Tampão fosfato 0.1 N pH 7.0 Emulsão c/ goma arábica e óleo de oliva	4.8

comparativo da atividade de lipase em tempos de fermentação de 24, 48 e 72 horas no meio de cultivo 2 descrito no item 3.2.2.2, a temperatura de 30°C.

#### **4.5 Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica da linhagem produtora de lipase.**

A linhagem selecionada como melhor produtora de lipase foi identificada como pertencente ao gênero *Geotrichum sp*, pelas características apresentadas de crescimento, e pelos resultados de testes bioquímicos realizados e descritos .

##### 1. Divisão Celular

###### 1.1. Reprodução Vegetativa:

As células apresentam-se na forma de cilindros, curtos e longos, e dividem-se por fissão.

###### 1.2. Características das células vegetativas

###### 1.2 a) Crescimento em meio líquido e sólido:

As células vegetativas apresentaram-se cilíndricas longas e curtas.

Meio líquido: Ocorreu a formação de película.

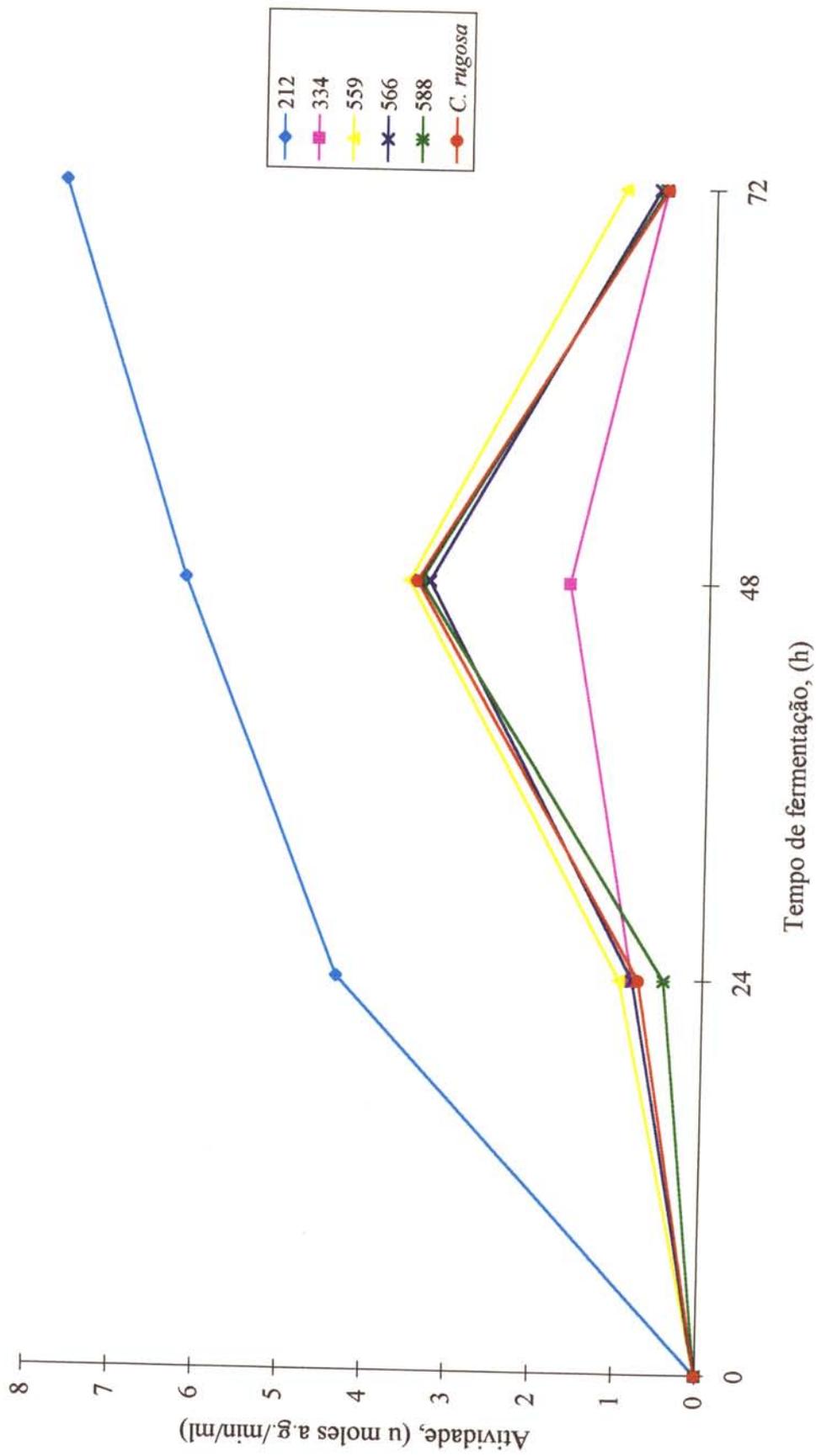
Meio sólido: Colônias brancas cremosas, filamentosas, espalhadas sem profundidade com borda irregular. Sem odor ou brilho.

Apresentou bom crescimento quando o meio apresentava em sua composição extrato de malte e extrato de levedura.

###### 1.2 b) Formação de Pseudomicélio e Micélio verdadeiro:

A colônia mostrou formação de micélios verdadeiros após 48 horas de crescimento a 30°C com formação de artrosporos. As colônias jovens apresentam micélios na forma de filamentos longos que se quebram em

FIGURA 3 - Seleção da linhagem melhor produtora de lipase



artrosporos assim que a colônia envelhece. Os artrosporos são cilíndricos com extremidades arredondadas.

As figuras 4A e 4B apresentam as características morfológicas da colônia da linhagem nº 212, bem como a formação do micélio e artrosporos.

## 2. Características fisiológicas e bioquímicas da Linhagem nº 212

A tabela 3 indica as características fisiológicas e bioquímicas da linhagem nº 212 dando sequência aos testes realizados para identificação do gênero da linhagem nº 212.

### **4.6 Estudo dos parâmetros para produção de enzima pela linhagem 212, selecionada como melhor produtora de lipase.**

#### **4.6.1 Seleção do melhor meio de Cultivo para Produção de lipase por *Geotrichum sp.***

Os resultados obtidos na seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por *Geotrichum sp* estão dispostos na figura 05. O meio de cultivo onde se obteve maior produção de lipase pela linhagem de *Geotrichum sp* foi o meio C composto por 1.5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 3% de extrato de levedura e 0.2% de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

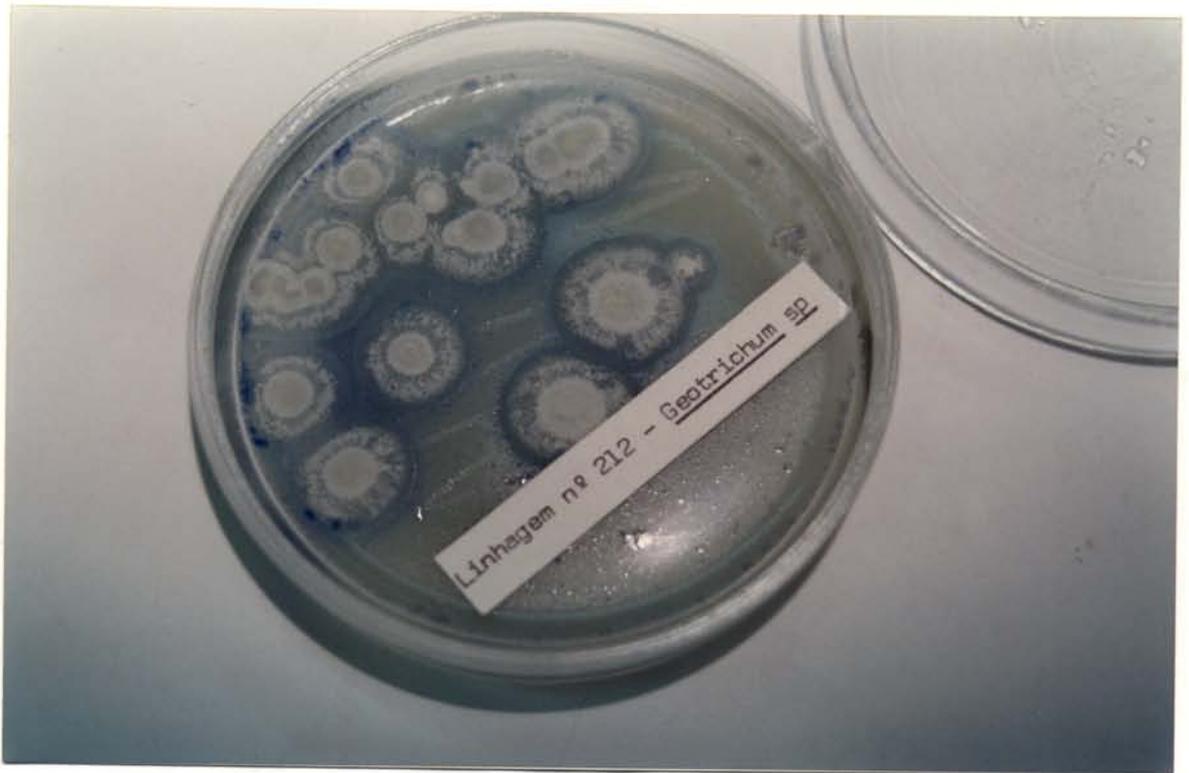
Observa-se que os meios A e B continham óleo de oliva em sua composição, como principal fonte de carbonos. O meio C não continha óleo em sua composição, sendo a fonte de carbono a farinha de trigo. Os três meios, A, B e C possuíam rica fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico em sua composição.

O meio D utilizado para a produção de lipase ( fermentação sólida) mostrou-se pouco eficiente para a linhagem de *Geotrichum sp.*

Nagaoka et alii (46) relataram a produção de lipases utilizando linhagem isolada de *Mucor sp.* O microrganismo foi cultivado em meio líquido constituído de 4 % de amido solúvel, 3 % de farelo de soja, 0.1 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e 0.2 % de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , pH final 6.5. A produção de lipase foi extremamente afetada pela fonte de nitrogênio do meio sendo que a combinação de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e farelo de soja pareceu ser a mais adequada.

Tsujisaka et alii (76) compararam as propriedades de lipases fúngicas produzidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*,

**FIGURA 4A - Linhagem nº 212 - *Geotrichum sp.***



**FIGURA 4B - Fotomicrografia com aumento de 400 x em microscópio óptico da linhagem nº 212 - *Geotrichum sp.***



**TABELA 3 - Características Fisiológicas e Bioquímicas da linhagem nº 212**

**Características Fisiológicas e Bioquímicas**

1. Assimilação de Nitrato	-
2. Teste de Diazonium Blue B	-
3. Formação de Película	+
4. Urease	-

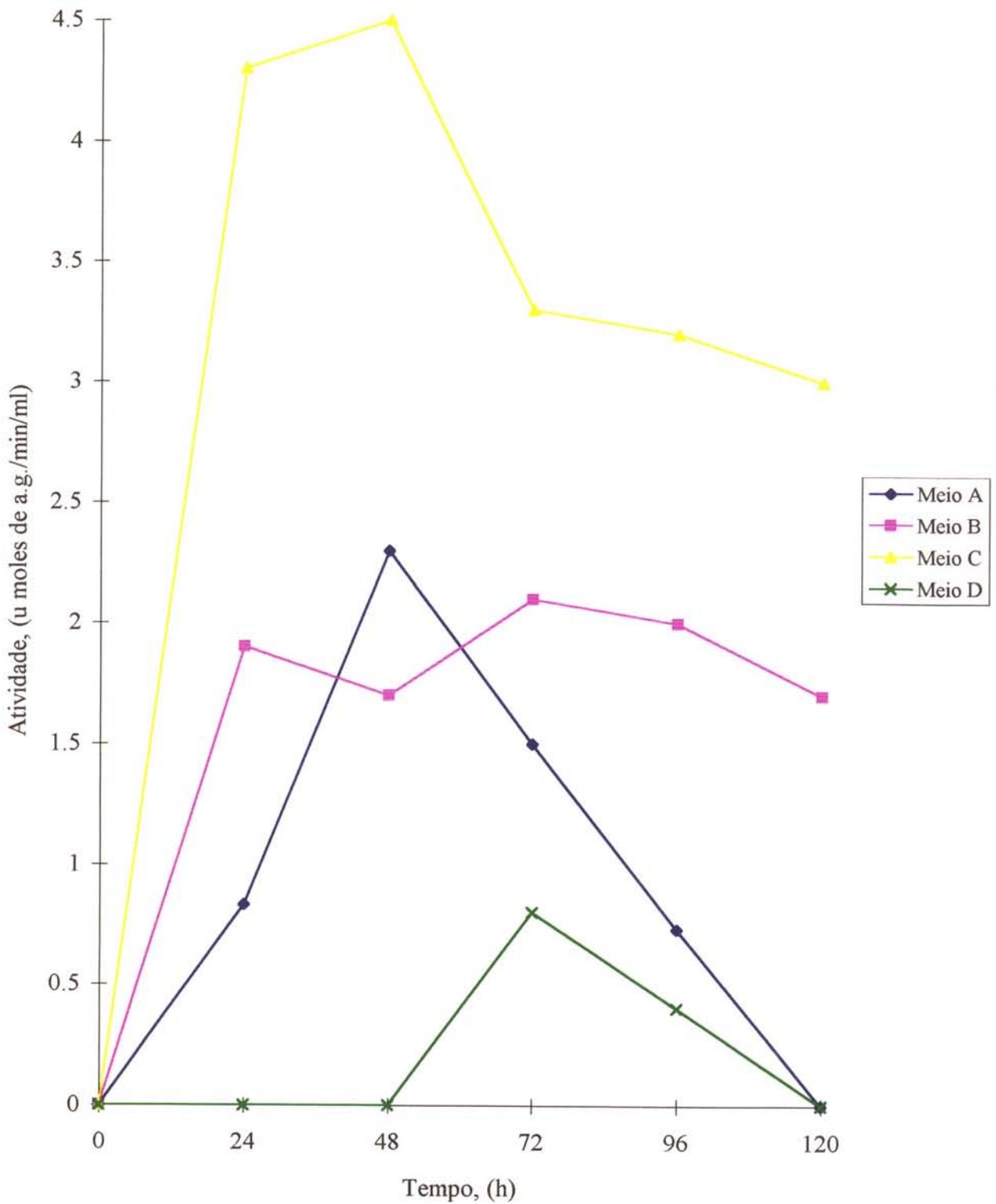
**Fermentação de Carboidratos**

1.D-glucose	+
2.D-galactose	-
3.Maltose	-
4.Lactose	-
5. Rafinose	-
6.Sacarose	-

**Assimilação de Carboidratos**

+
+
-
-
-
-

**FIGURA 5 - Seleção do melhor meio de cultivo para produção de lipase por *Geotrichum sp***



*Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Com relação ao meio de cultura para produção de lipase, foi verificado que *Aspergillus niger* produzia lipase em meio semi sólido composto de farelo de trigo e  $\text{CaCO}_3$ . Os outros 3 fungos produziram grande quantidade de lipase durante o crescimento em meio líquido com alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono.

A influência das condições nutricionais e de cultivo na produção de lipase por *Aspergillus niger* em cultura submersa foram estudadas por Pal et alii (55), que relataram a importância da fonte rica em nitrogênio orgânico na produção de lipase. Cutchins et alii (13) estudaram a influência da composição do meio de cultivo na produção de lipase pela levedura *Mycotorula lipolytica*. Verificaram que a presença de 0.05 % de glucose aumentou a produção de lipase e que na presença de óleo de oliva e glucose não houve produção de lipase.

#### 4.6.2. Estudo do efeito da adição de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase por *Geotrichum sp.*

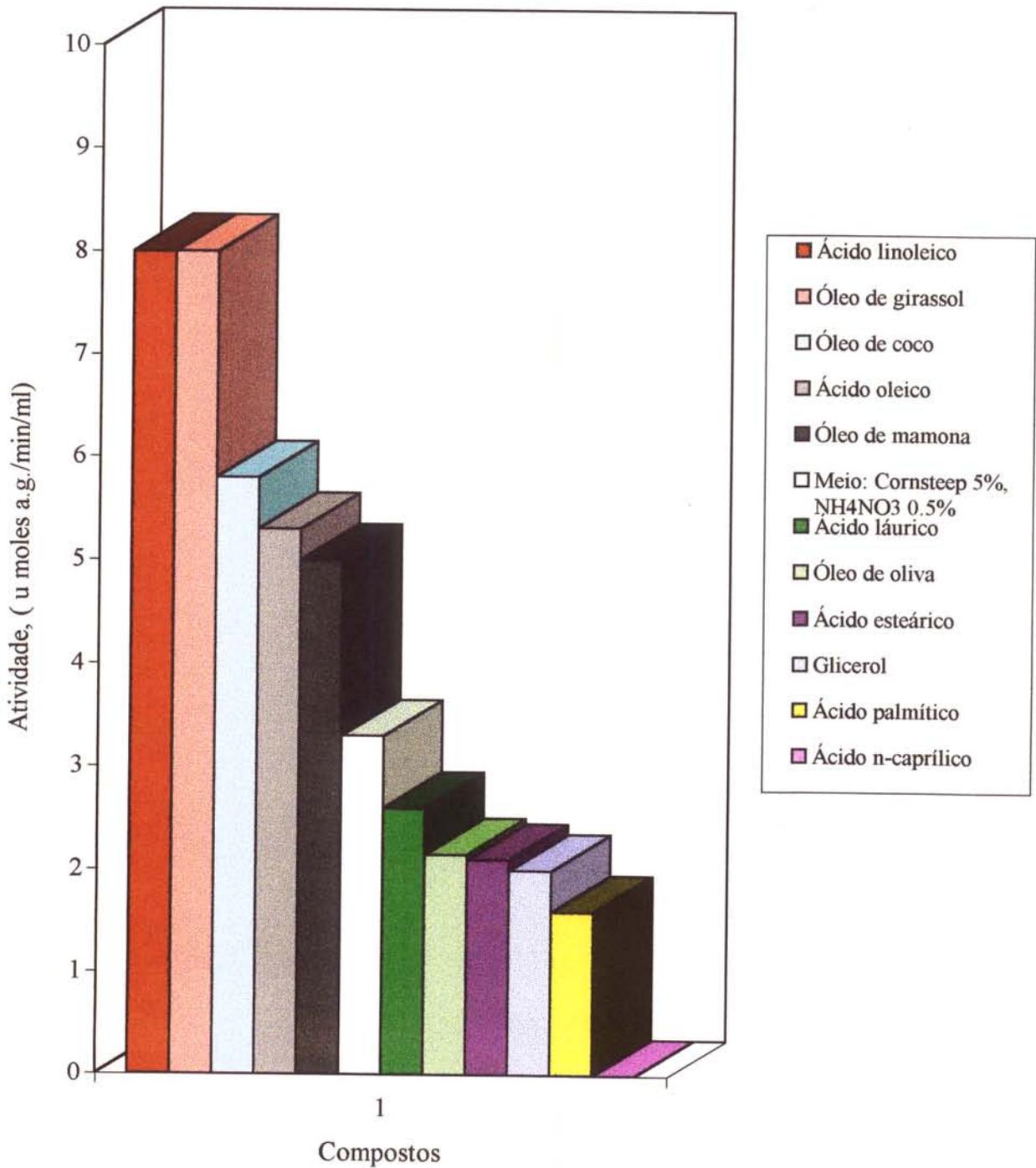
A produção de lipase pela linhagem de *Geotrichum sp* foi testada em meio líquido composto de 5 % de "corn steep liquor" (água de maceração de milho) e 0.5 % de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  adicionando-se diferentes fontes de carbono. A figura 06 traz os resultados obtidos.

A produção de lipase por *Geotrichum sp* foi fortemente induzida quando ácido linoleico e óleo de girassol foram adicionados ao meio de cultivo na concentração de 1 %. Ligeira indução ocorreu quando foram adicionados ácido oleico, óleo de côco e óleo de mamona, na mesma concentração de 1 %.

Shimada et alii (66) estudaram a indução de lipase de *Geotrichum candidum* por adição de ácidos de cadeia carbônica longa, na concentração de 1 % ao meio de cultivo. Verificou-se que o ácido oleico é o maior indutor de lipase, seguido pelo metil palmitato. O meio utilizado neste estudo foi constituído de 5 % de "corn steep liquor" e 0.5 % de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  com ou sem adição de compostos indutores de lipase. Este meio apresenta alta concentração de nitrogênio sendo relativamente pobre na fonte de carbono.

Iwai et alii (24) estudaram a produção de lipase por *Geotrichum candidum* Link, que em referências anteriores, havia mostrado produzir lipase em meio de cultivo sem adição de lipídeo. Embora o microrganismo crescesse bem em meio composto de "corn steep liquor" 3%, peptona 5%, glucose 1 %, a presença de farelo de arroz era essencial para a produção

**FIGURA 6 - Estudo do efeito da incorporação de fontes de carbono ao meio de cultivo na produção de lipase de *Geotrichum sp***



de lipase. Verificou-se que a porção lipídica do farelo de arroz é que era responsável pela indução da produção de lipase. Ao adicionarem vários óleos ao meio de cultivo, verificaram que o ácido oleico no meio de cultivo na concentração de 1 % foi o mais efetivo na indução, tanto em meio líquido como sólido.

A influência de diferentes tipos de glicerídeos na indução de lipase em *Mucor hiemalis* foi também estudada por Aktar et alii (5). A produção de lipase foi aumentada com a adição de óleo de oliva ao meio fermentativo

Tahoun et alii (73) estudaram também a influência do meio de cultivo com diferentes fontes de carbonos na indução de lipase por *G. candidum*. O microrganismo foi incubado à temperatura de 30 °C em meio de cultivo composto por tripticase e minerais, adicionando como fontes alternativas de carbonos glucose, óleo de oliva, ácido oleico ou Tween 80. A atividade de lipase extracelular produzida é maior na presença de óleo de oliva, seguido pela presença de glucose. Ácido oleico e Tween 80 inibiram fortemente a produção de lipase extracelular aumentando a produção de lipase micelial pelo microrganismo.

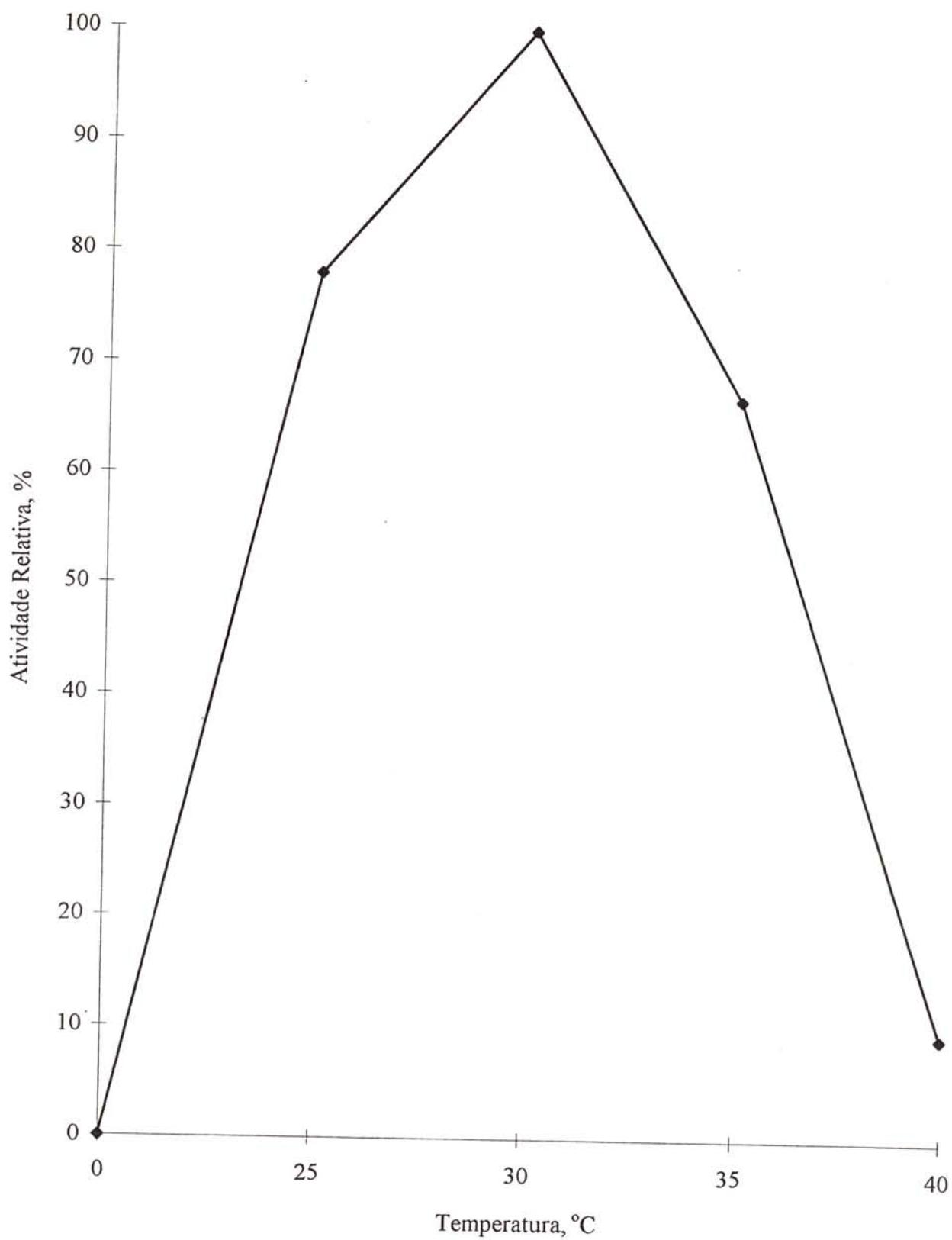
Ota et alii (53) estudaram a indução da produção de lipase de *Candida paralipolytica* por lipídeos e substâncias derivadas. Vários ácidos graxos foram adicionados ao meio de cultivo e verificou-se que ácidos graxos , insaturados, especialmente o ricinoleico, foram os mais efetivos na produção de lipase. Em trabalho subsequente (54) os mesmos autores verificaram que a levedura *Candida cylindracea* produzia pouca atividade lipolítica em meio de cultivo sem a presença de lipídeo ou ainda, pela adição de somente um tipo de lipídeo.

Este experimento foi importante para esclarecer a influência de óleos e ácidos graxos na produção de lipase extracelular por *Geotrichum sp*. A produção de lipase pela linhagem de *Geotrichum sp* foi fortemente induzida na presença de ácido linoleico bem como de óleo de girassol, resultados estes mais expressivos do que os obtidos com óleo de oliva e ácido oleico.

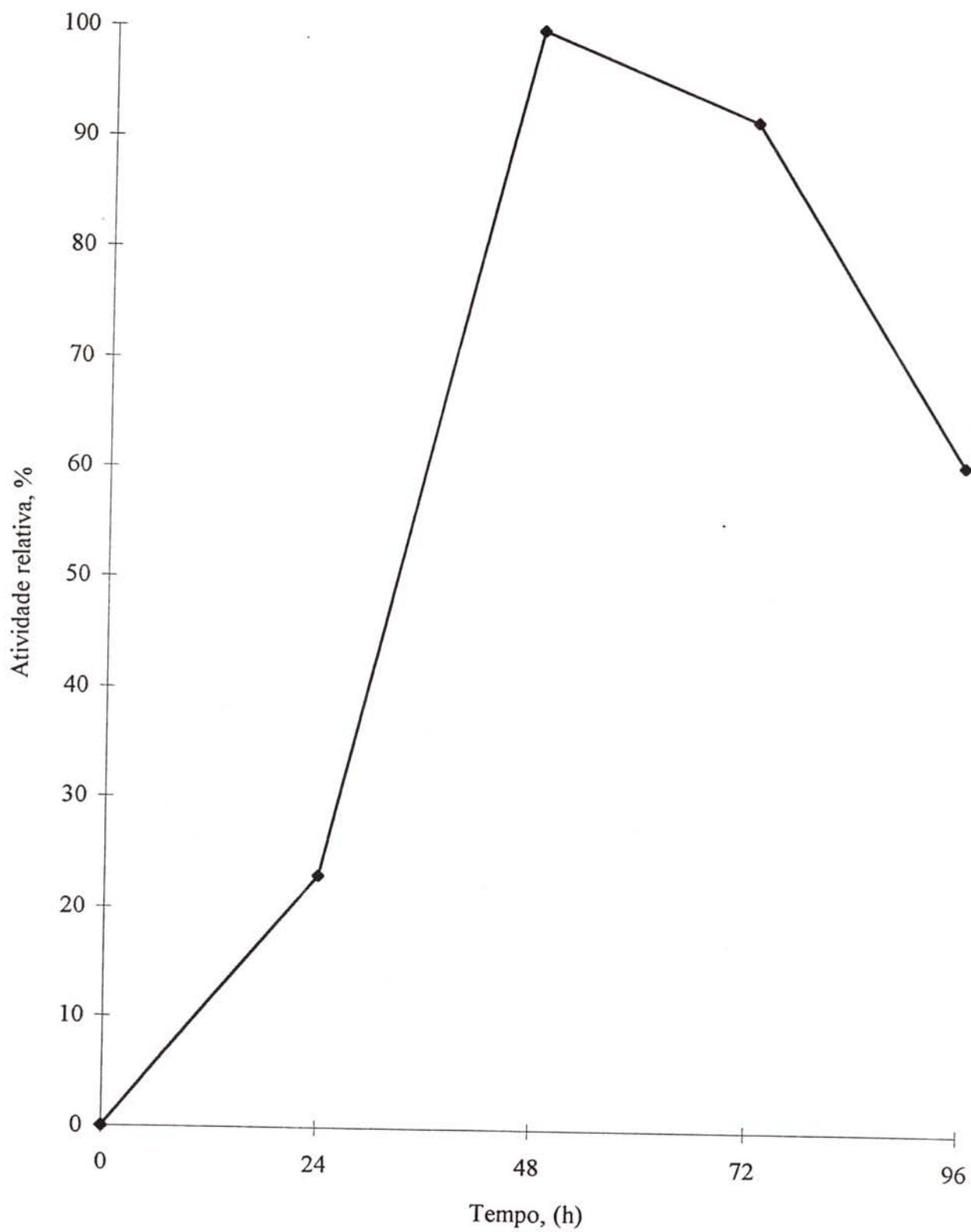
#### **4.6.3 Efeito da Temperatura e Tempo de fermentação na produção de lipase por *Geotrichum sp*.**

A máxima produção de lipase por *Geotrichum sp* foi obtida a temperatura de 30 °C após 48 horas de fermentação em meio de cultivo composto por 1.5 % de farinha de soja desengordurada, 1 % de farinha de

**Figura 7A - Efeito da temperatura de fermentação na produção de lipase por *Geotrichum sp***



**FIGURA 7B - Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase por *Geotrichum sp.***



trigo, 3 % de extrato de levedura, 0.2 % de nitrato de amônio, pH 5.0. Os resultados estão dispostos nas figuras 7A e 7B.

Pal et alii (55) estudaram a produção de lipase por *Aspergillus niger* concluindo que as condições ideais para produção de lipase foram obtidas com 96 horas de fermentação em cultura submersa a 35 °C.

Baillargeon et alii (7) estudaram 3 linhagens de *Geotrichum candidum* (ATCC 39614, NRRL Y552 e NRRL Y 553) para produção de lipase. A produção máxima de lipase pelas 3 linhagens foi obtida por fermentação líquida em meio contendo óleo ou glicerol, a 30 °C, 300 rpm, pH neutro por 24 horas.

#### 4.7 Produção de lipase pela linhagem de *Geotrichum sp.*

Foram obtidas aproximadamente 6 unidades de atividade por ml de centrifugado do meio de cultura na fermentação da linhagem de *Geotrichum sp* em o meio de cultura composto por 1.5% de farinha de soja desengordurada, 1% de farinha de trigo, 3% de extrato de levedura, 0.2% de nitrato de amônio, incubado a 30°C por 48 horas .

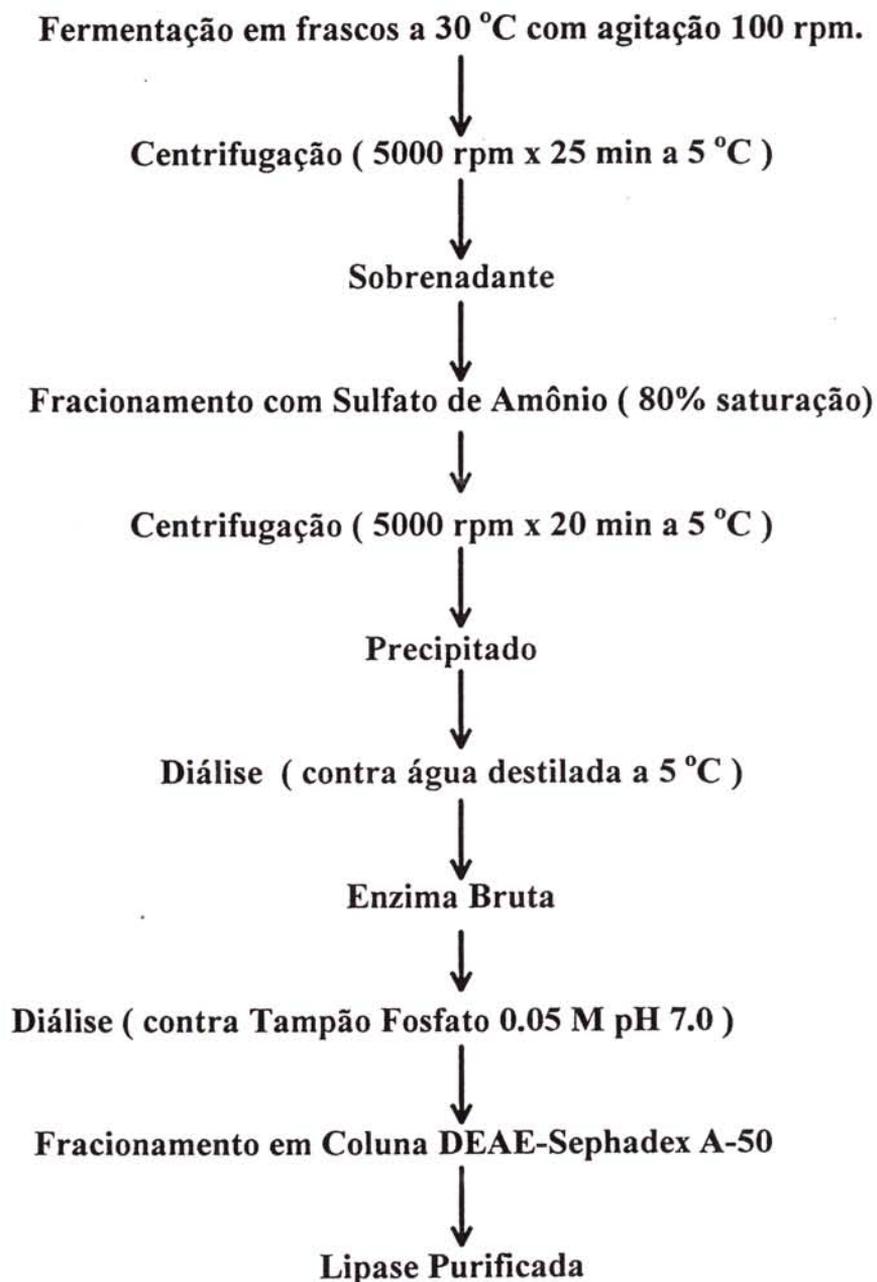
#### 4.8 Purificação da lipase

A purificação da lipase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.18.

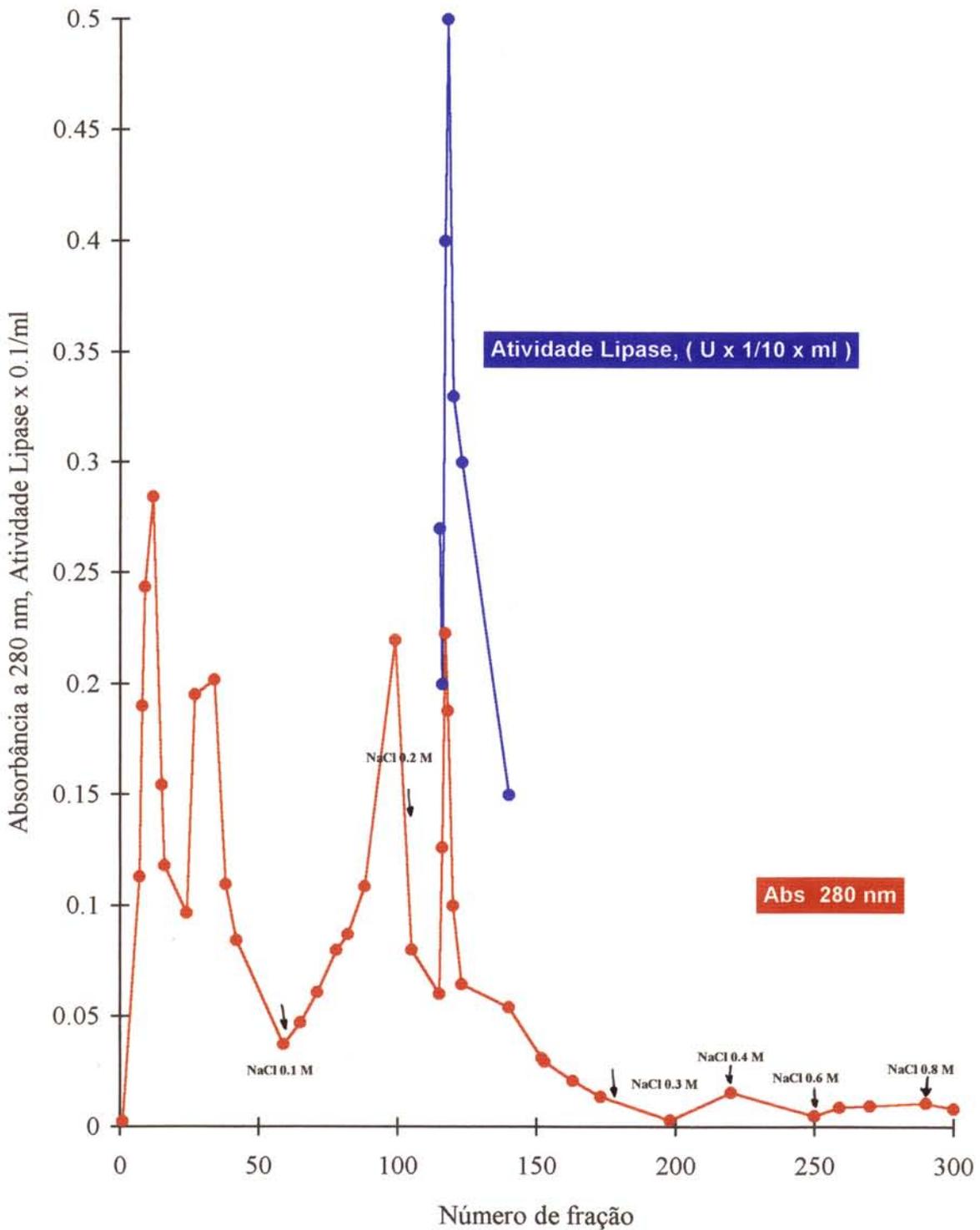
O fluxograma de purificação da lipase de *Geotrichum sp* está descrito na figura 8.

A lipase de *Geotrichum sp* foi obtida por fermentação posterior centrifugação do meio de cultura e fracionamento com sulfato de amônio.No fracionamento da preparação bruta de lipase em coluna DEAE- Sephadex A-50 equilibrada com tampão acetato 0.05 M pH 5.0, a enzima adsorvida na resina foi eluída com tampão acetato 0.05 M pH 5.0, contendo 0.2 M de NaCl. A figura 9 ilustra o fracionamento da lipase. A purificação está sumarizada na tabela 04. A enzima foi purificada 6 vezes após fracionamento com sulfato de amônio. Após a cromatografia em coluna de DEAE- Sephadex A50, a lipase foi purificada 16.5 vezes. Na figura 09 pode-se observar que na concentração de 0.2 M de NaCl foram eluídas as frações com atividade lipolítica; não foram obtidas outras frações dentro do gradiente de NaCl utilizado, que apresentassem atividade lipolítica.

**FIGURA 8 - Fluxograma de produção e purificação de lipase de *Geotrichum sp.***



**FIGURA 9 - Cromatografia de Troca Iônica de lipase de *Geotrichum sp* em Coluna DEAE-Sephadex A-50**



**TABELA 4 - Purificação da lipase de *Geotrichum sp.***

Etapa de Procedimento	Volume (ml)	Unidades/ml (µmoles a.g /min)	Atividade Total Unidades	Proteína (µg/ml)	Atividade Especifica (Unid/ug) Proteína	Purificação %	Recuperação %
Sobrenadante do meio de cultura	800	1.7	1360	7.4	0.23	1	100
Fracionamento com Sulfato de Amônio	22	40	880	30	1.33	6.0	64.7
Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50	37.5	13.2	495	3.4	3.88	16.5	36.4

Tsujisaka et alii (77) purificaram a lipase de *Geotrichum candidum* com sulfato de amônio, fracionamento em coluna de DEAE-Sephadex e permeação em gel com Sephadex G-100 e G-200. Foi encontrada uma só fração proteica com atividade lipolítica com peso molecular entre 53000 e 55000 Daltons.

Jacobsen et alii (26), purificaram a lipase de *Geotrichum candidum* por cromatografia em coluna de Sephadex G-100, onde foram encontrados dois picos diferentes, com atividade lipolítica. Os autores encontraram um alto grau de heterogeneidade entre as lipases, demonstrado por imunoelektroforese, o que indica múltiplas formas de enzimas produzidas.

#### 4.9 Caracterização da lipase bruta e purificada

As características bioquímicas da lipase de *Geotrichum sp* foram determinadas como descrito nos itens 3.2.10 e 3.2.19.

##### 4.9.1. Efeito do pH na atividade enzimática.

O efeito do pH na atividade da enzima bruta foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.1.1 e o efeito do pH na atividade da enzima purificada foi realizado de acordo com o método descrito em 3.2.19.1.1.

A figura 10 mostra que o pH de máxima atividade para enzima bruta está na faixa entre 5 e 7 e que para a enzima purificada o pH ótimo de atividade está entre 7 e 8, obtidos com tampão Fosfato e Borato 0.1 M.

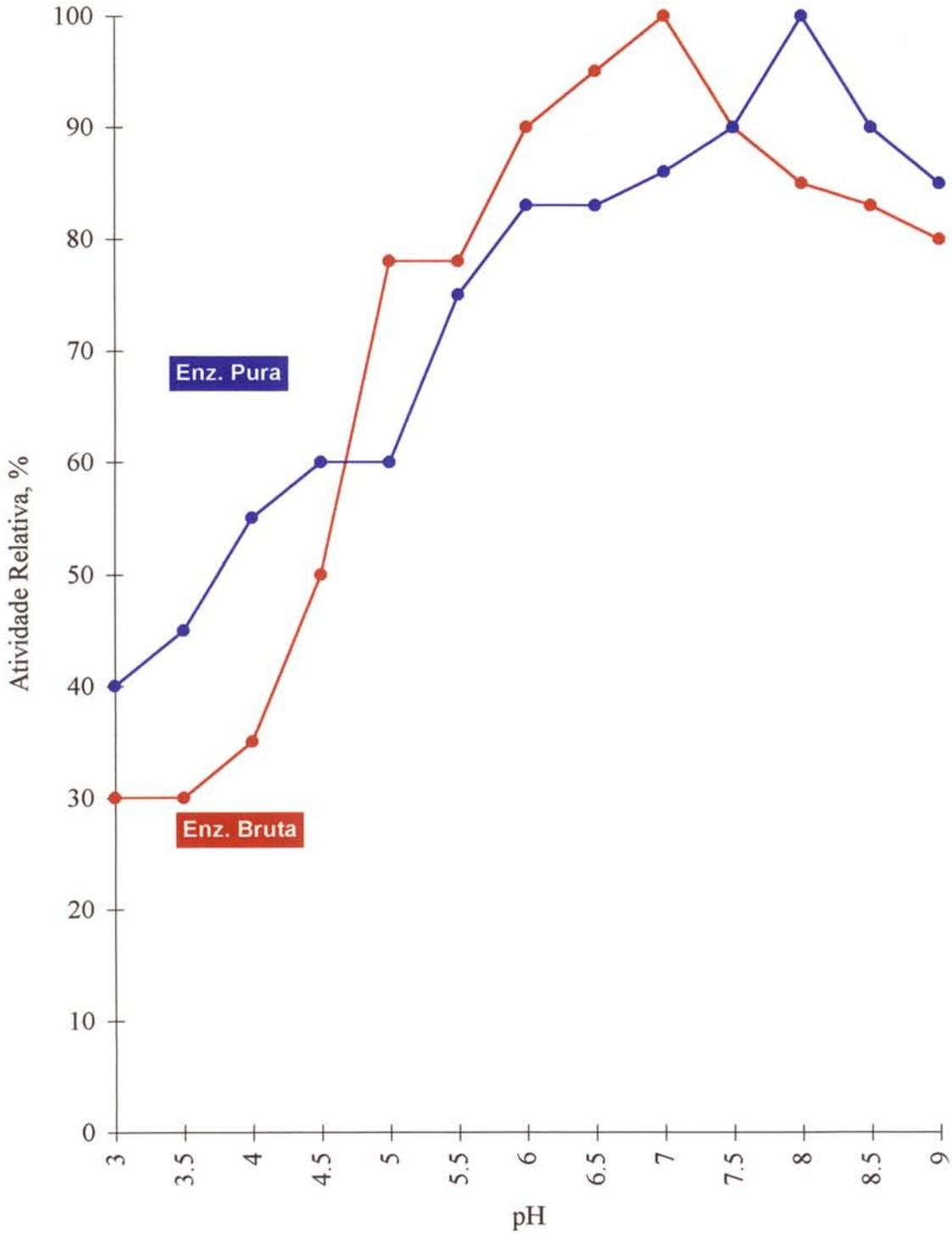
A lipase produzida por *Geotrichum candidum* apresentou pH ótimo entre 8.1 e 8.5 conforme o relato de Marks et alii (41) em 1968.

Tsujisaka et alii (78) estudando as propriedades da lipase de *Geotrichum candidum* verificaram que a enzima foi mais ativa em valores de pH entre 5.6 e 7.0.

Baillargeon et alii (7) estudaram 3 linhagens diferentes de *Geotrichum candidum* para produção de lipase e estudo das características destas enzimas. A maior atividade lipolítica se deu para as 3 lipases, a pH neutro, segundo os autores.

Philips e Pretorius (60) estudando a produção de lipase por *Galactomyces geotrichum*, um fungo semelhante ao *Geotrichum candidum*, verificaram que a lipase produzida por este fungo possuía atividade máxima com pH a 7.75.

**FIGURA 10 - Efeito do pH na atividade de lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp***



**TABELA 5 - Características bioquímicas de lipases microbianas**

<b>Enzima</b>	<b>Fonte</b>	<b>pH ótimo</b>	<b>Temperatura ótima ° C</b>	<b>Referência</b>
Lipase	<i>G.candidum</i>	7	30	7
Lipase	<i>G.candidum</i>	8.1 - 8.5	30	41
Lipase	<i>G.candidum</i>	5.6 - 7.0	40	77
Lipase	<i>G.candidum</i>	5.6 - 7.0	40	26
Lipase	<i>Mucor sp.</i>	8.0	37	46
Lipase	<i>P. nitroreducens</i>	9.5	--	82
Lipase	<i>P. fragi</i>	9.5	75 - 80	82
Lipase	<i>C. rugosa</i>	5.4	40	35
Lipase	<i>Rhodotorula pilimae I</i>	4.0	45 - 50	44
Lipase	<i>R. pilimae II</i>	7.0	45 - 50	44
Lipase	<i>Galactomyces geotrichum</i>	7.75	30	60
Lipase	<i>C. parapsilosis</i>	6.5	45	63

A lipase de *Geotrichum sp* apresenta atividade máxima em pH dentro da faixa das enzimas relatadas de *Geotrichum candidum*. A tabela 05 ilustra o pH ótimo para a atividade de diferentes lipases microbianas.

#### 4.9.2 O efeito do pH na estabilidade da enzima.

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com os itens 3.2.10.1.2 e 3.2.19.1.2.

A figura 11 ilustra o efeito do pH na estabilidade da enzima. As lipases de *Geotrichum sp* purificada e bruta apresentaram-se mais estáveis na faixa de pH entre 5.0 e 8.0 para a enzima bruta e entre 7.0 e 9.0 para a pura, sendo inativada a pH inferiores a 4.5 ou superiores a 8.2 após 24 horas de incubação à temperatura ambiente.

Tsujisaka et alii (77) analisaram as propriedades da lipase purificada de *Geotrichum candidum* verificando que a enzima foi estável na faixa de pH de 4.6 a 9.8 após tratamento por 24 horas a 30 °C.

Houve pequena variação na estabilidade em diferentes valores de pH para a lipase pura e bruta de *Geotrichum sp*, que apresentou-se semelhante a lipase de *Geotrichum candidum* relatada na literatura por Tsujisaka et alii (77).

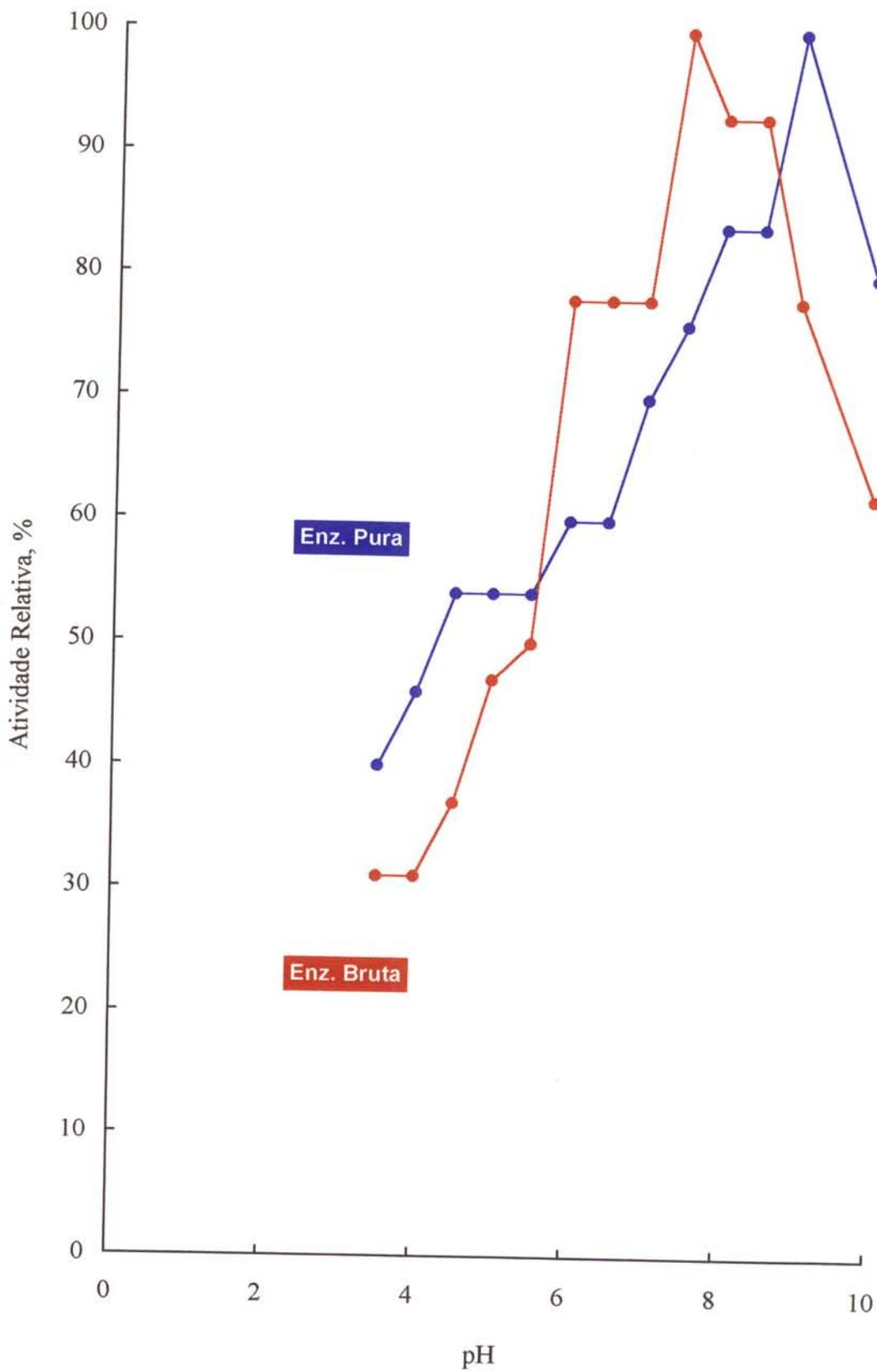
#### 4.9.3. Efeito da temperatura na atividade enzimática.

O efeito da temperatura na atividade de lipase foi determinado de acordo com os métodos descritos nos itens 3.2.10.2.1 e 3.2.19.2.1. A figura 12 mostra que a lipase de *Geotrichum sp* purificada e bruta apresenta atividade ótima a temperatura de 45 °C.

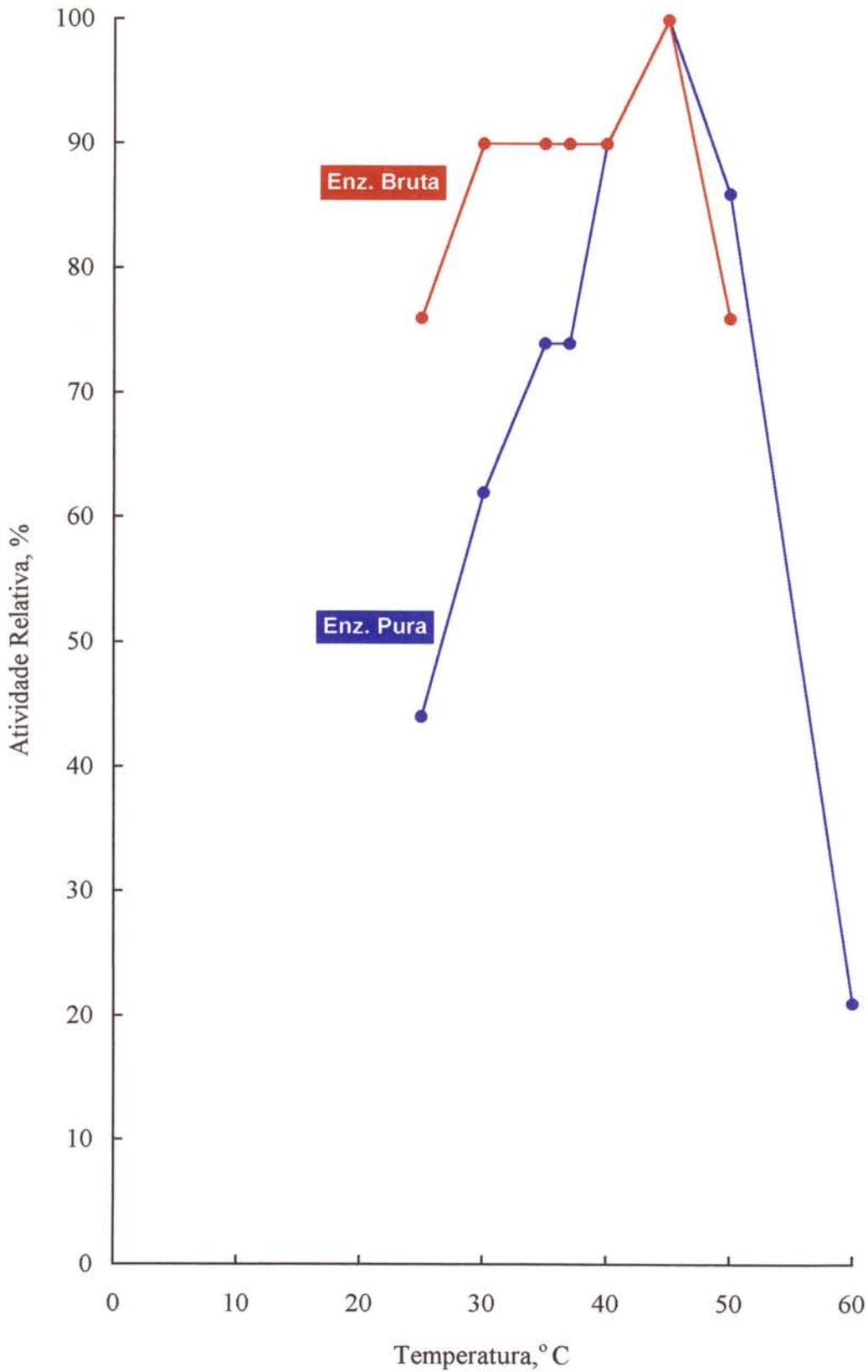
A literatura reporta, para diferentes formas moleculares de lipase de *Geotrichum candidum* que a temperatura ótima está entre 30 e 40 °C como verifica-se em Jensen et alii (30); Baillargeon et alii (7); Marks et alii (41) e Tsujisaka (77).

Riaublanc et alii (63) descreveram que a temperatura ótima da lipase de *Candida parapsilosis* se situa na faixa entre 40-50 °C. Mudherwa et alii (44) verificaram que a temperatura de máxima atividade da lipase produzida por *Rhodotorula pilimae* se encontra na faixa entre 45-50 °C.

**FIGURA 11 - Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp***



**FIGURA 12 - Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp***



#### 4.9.4 Estabilidade térmica da enzima.

O estudo referente ao efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi realizado de acordo com as condições descritas nos itens 3.2.10.2.2 e 3.2.19.2.2. A figura 13 ilustra os resultados obtidos. A lipase purificada e bruta de *Geotrichum sp* foi tratada nas temperaturas de 25, 30, 40, 50, 70, 90 e 100 °C durante uma hora na ausência de substrato e verificou-se que a lipase bruta de *Geotrichum sp* reteve 40 % de atividade quando tratada a temperatura de 50 °C, e 95% de atividade quando tratada a 50°C, purificada. A fração purificada da lipase de *Geotrichum sp* apresentou maior termoestabilidade que a bruta.

Dentre as lipases fúngicas descritas por Tsujisaka et alii (76) as lipases produzidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* apresentaram termoestabilidade a 50, 65, 45, 50 e 40 °C respectivamente quando tratadas por 15 minutos em pH 5.6.

Yamaguchi et alii (83) estudaram a lipase de *Chromobacterium viscosum* e verificaram que a enzima retém 80 % de atividade quando tratada por 10 minutos a 70 °C.

Ballargeon (8) estudou a lipase purificada de *Geotrichum candidum* e verificou que a lipase se mostrou estável com 99 % de atividade residual após incubação a 30 °C por 24 horas.

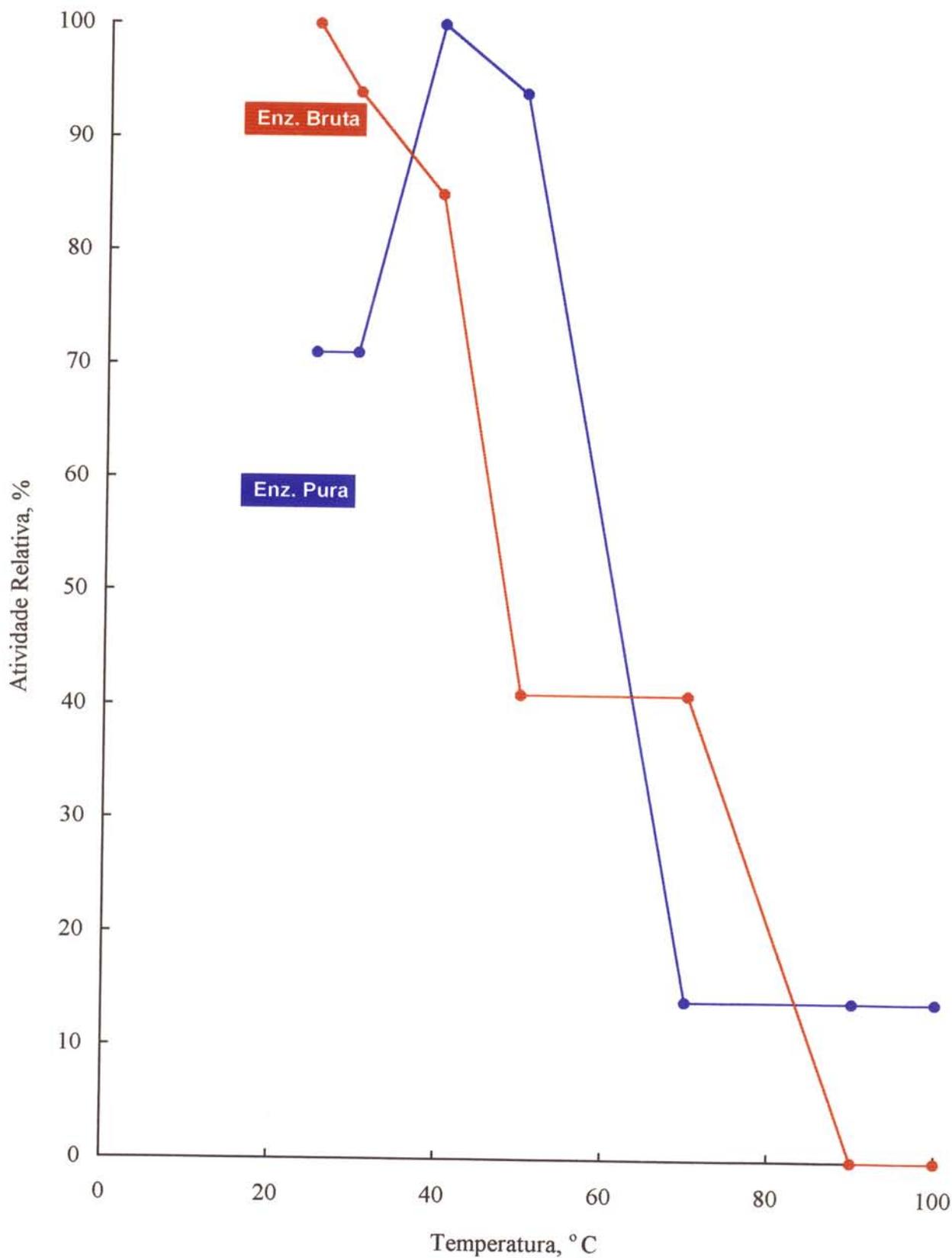
#### 4.9.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática.

O efeito de sais minerais na atividade da enzima de *Geotrichum sp* purificada e bruta foi testado de acordo com as condições descritas nos itens 3.2.15 e 3.2.21.

Verificou-se que  $MgSO_4$  na concentração 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação, ativou a enzima bruta em 46 % e em 45% a enzima pura. A enzima bruta de *Geotrichum sp* foi fortemente inibida na presença de  $AgNO_3$  e  $CaCl_2$  na mesma concentração. A enzima purificada sofreu inibição moderada na presença de  $CuSO_4$  e na presença de  $CaCl_2$  e  $AgNO_3$  não foi afetada significativamente. A tabela 6 apresenta os resultados.

Em contrapartida, Tsujisaka et alii (76) relataram que as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* foram ativadas pelo íon cálcio. Foi observado que a ativação não ocorre no início da reação enzimática,

**FIGURA 13 - Estabilidade térmica da lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp***



**TABELA 6 - Efeito de sais minerais na atividade de lipase purificada e bruta de *Geotrichum sp.***

Sal ( 1 mM )	% Atividade Relativa	
	Enzima Bruta	Enzima Pura
NaSO <sub>4</sub>	121	120
MgSO <sub>4</sub>	146	145
MnSO <sub>4</sub>	105	128
CaCl <sub>2</sub>	62	117
AgNO <sub>3</sub>	49	106
CuSO <sub>4</sub>	76	75
KCl	127	106
LiSO <sub>4</sub>	124	106
CoCl <sub>2</sub>	115	95
FeSO <sub>4</sub>	96	104
ZnSO <sub>4</sub>	120	128

porém, somente após o acúmulo de ácido oleico. Portanto, a ativação parece depender do aumento do estado de emulsificação do sistema de reação. As lipases foram inibidas pela presença de íons  $Fe^{++}$  ou  $Fe^{+++}$ .

Yamaguchi et alii (83) estudando a lipase de *Chromobacterium viscosum* verificaram que esta foi estimulada na presença de íons  $Ca^{++}$ ,  $Ag^{++}$  e  $Sn^{++}$ .

Jacobsen et alii (27) tentaram explicar o mecanismo de ativação da lipase de *Geotrichum candidum* pelos íons  $Ca^{++}$ . Segundo os autores, o meio reacional pareceu influenciar na especificidade da enzima, e isso pode ser explicado pelo acúmulo de ácidos graxos livres após algum tempo de hidrólise na interface enzima-substrato, impedindo o prosseguimento da hidrólise. O papel do  $Ca^{++}$  seria formar compostos insolúveis com o ácido oleico evitando a inibição do hidrólise.

Petrovic et alii (59) relataram que a lipase de *Penicillium roqueforti* &-86 foi ativada na presença de sais de sódio e potássio na concentração de 1mM e pelos cátions  $Mn^{++}$  e  $Ca^{++}$ , sendo severamente inibida na presença de  $Fe^{+++}$ .

#### 4.9.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática.

O efeito de inibidores na atividade de lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp* foi testado de acordo com o método descrito nos itens 3.2.16. e 3.2.22. Os testes foram realizados de modo a conseguir-se uma concentração final de inibidor no meio de reação de 1 mM e 5 mM. A tabela 07 ilustra os resultados.

Verificou-se que a enzima purificada não sofreu a ação inibitória de nenhum agente, nem na concentração de 1 mM nem na concentração de 5 mM.

A enzima bruta teve sua atividade inibida em 29% pelo reagente p-cloro-mercuribenzoato na concentração de 5 mM. Iodoacetamida na concentração de 1 mM e 5 mM não exerceu efeito sobre a atividade enzimática. Mercaptoetanol na concentração de 5 mM inibiu em 20 % a atividade enzimática.

A lipase de *Geotrichum sp* não parece ser fortemente dependente das ligações S-S para exercer sua atividade catalítica, principalmente quando pura, sendo porém consideravelmente inibida por p-cloromercuribenzoato, quando bruta, um inibidor clássico de grupos tiol.

Jensen (30) em sua revisão sobre lipases obtidas por *Geotrichum candidum*, comenta que a proteína em questão é uma histidina-serina e

que a análise dos aminoácidos revelou que a enzima não possui cisteína e metionina.

#### 4.9.7 Hidrólise de glicerídeos pela lipase de *Geotrichum sp.*

A hidrólise de glicerídeos pela lipase de *Geotrichum sp* foi estudada em diferentes etapas.

##### 4.9.7.1 Hidrólise de óleo de oliva pela lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp*

A hidrólise de óleo de oliva pela lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp* foi realizada de acordo com o método descrito nos itens 3.2.11. e 3.2.22.

O efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise do óleo de oliva foi acompanhado incubando-se o sistema de reação por períodos de tempo variáveis como 3, 6, 9, 15 e 30 minutos, 1,2,4, 6, 8, 24, 48 e 72 horas.

A figura 14A demonstra que após 6 horas de reação a porcentagem de hidrólise pela lipase bruta é de 83%, 85% após 24 horas e que após 48 e 72 horas a porcentagem de hidrólise permaneceu em 90 %. A figura 14B ilustra a Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de hidrólise do óleo de oliva por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp.* Como pode ser verificado já nos estágios iniciais de hidrólise ocorre a formação de monoglicerídeos. A enzima produz também em estágios iniciais 2 tipos de diglicerídeos (1,2) dioleína e (2,3) dioleína. A produção de ácido oleico é progressivamente aumentada até o tempo de 6 horas de reação.

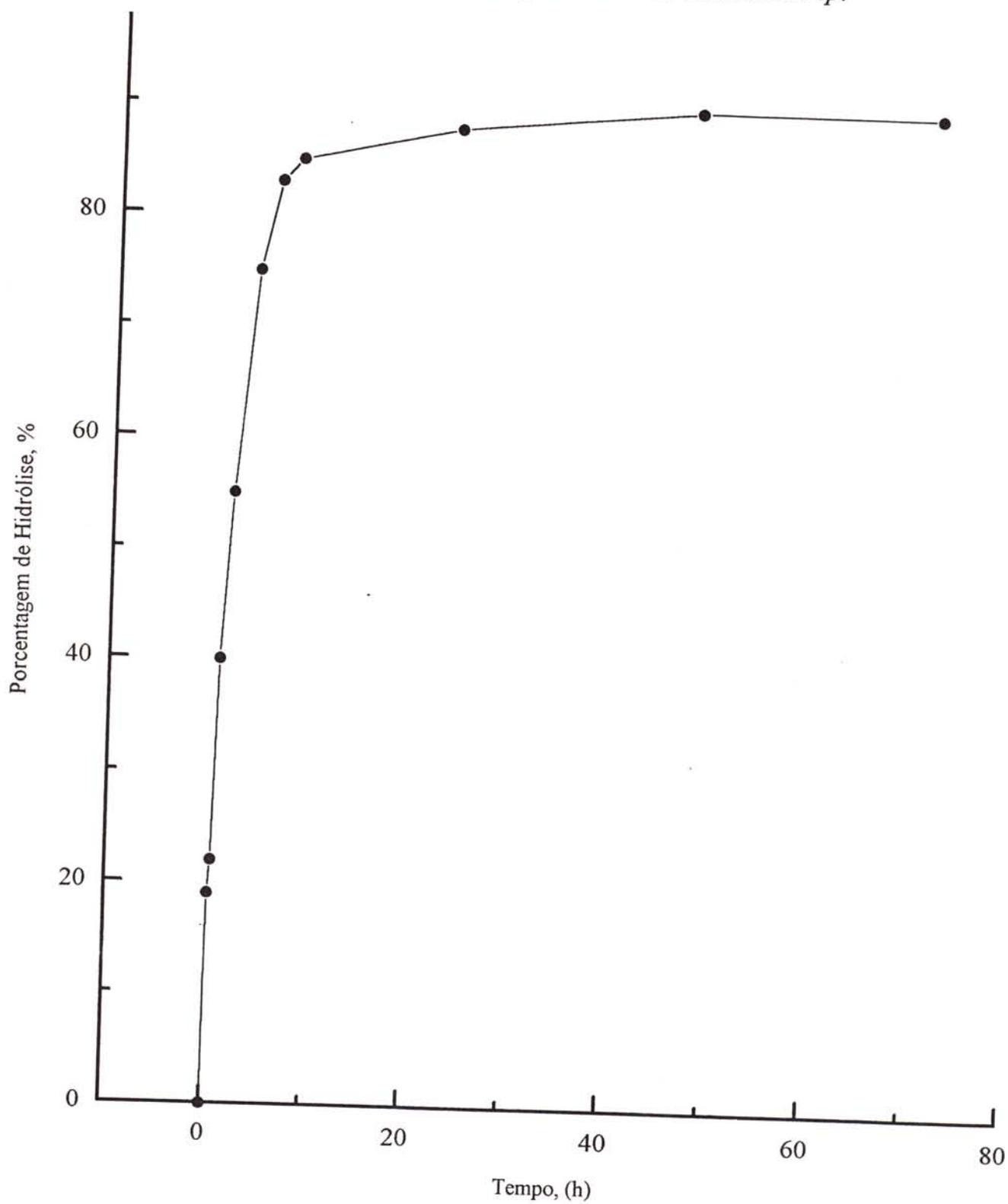
A figura 15 ilustra a Cromatografia em Camada Delgada dos produtos da hidrólise do óleo de oliva por ação da lipase purificada de *Geotrichum sp*, indicando que nos estágios iniciais de hidrólise há presença dos 2 tipos de diglicerídeos (1,2) dioleína e (2,3) dioleína. Monoleína e ácido oleico vão aumentando sua concentração após 4 horas de reação.

Baillargeon e Mc Carthy (9) estudaram várias linhagens de *Geotrichum candidum* para produção de lipase. Dentre outras observações, relatam que as lipases isoladas são similares, contudo, a especificidade de ação é variável com o tipo de linhagem e que as lipases

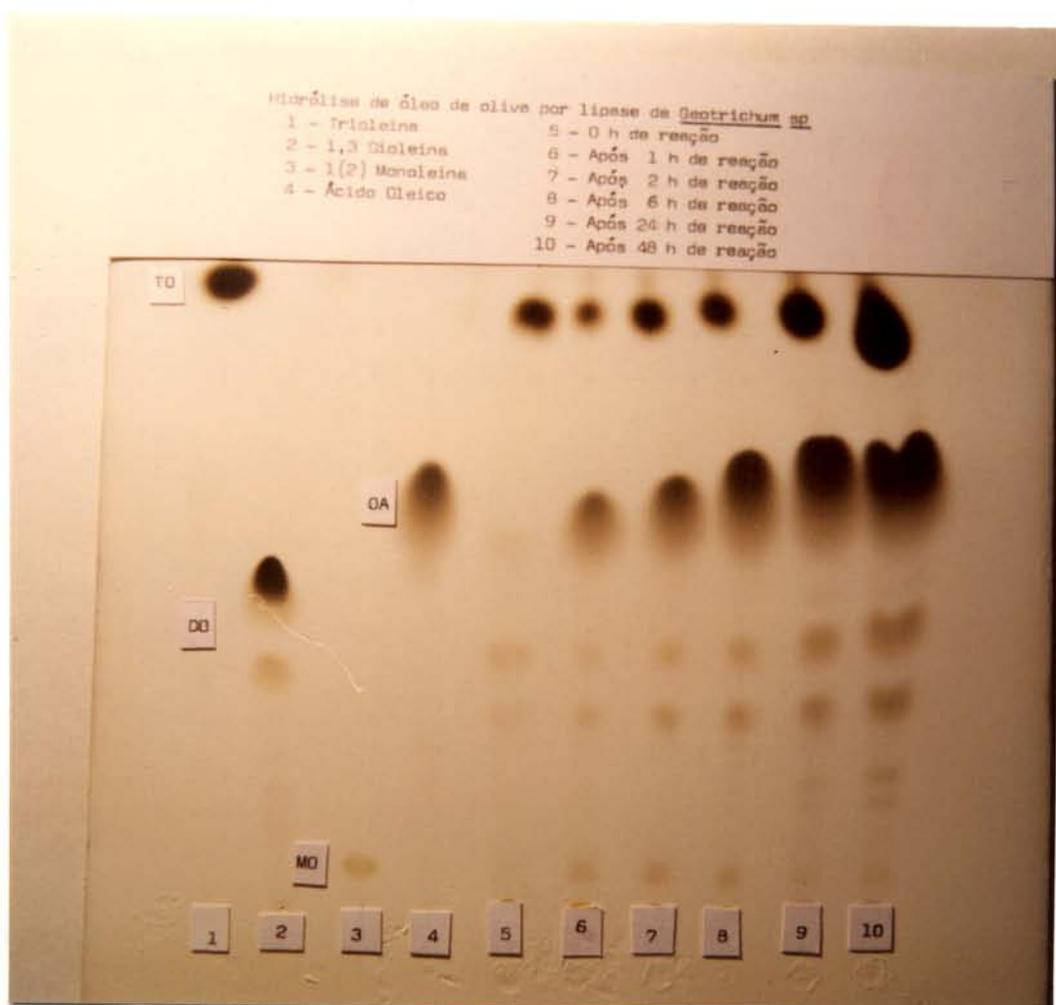
**TABELA 7 - Efeito de inibidores de enzimas na atividade de lipase bruta e purificada de *Geotrichum sp.***

Reagente	Atividade Relativa (%)			
	1 mM		5 mM	
	Enz. Pura	Enz. Bruta	Enz. Pura	Enz. Bruta
Mercaptoetanol	100	88	100	80
Cisteína	100	88	100	84
Bissulfito de Sódio	100	100	100	84
p-cloromercuribenzoato	100	91	100	71
Iodoacetamida	100	100	100	100

**FIGURA 14A - Efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp.***



**FIGURA 14B - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Hidrólise de Óleo de Oliva por Ação da Lipase Bruta de *Geotrichum sp***



- 1- Trioleína
- 2- 1,3 Dioleína
- 3- 1,(2) Monoleína
- 4- Ácido Oleico

- 5- 0h de reação
- 6- Após 1h de reação
- 7- Após 2h de reação
- 8- Após 6h de reação
- 9- Após 24h de reação
- 10- Após 48h de reação

**FIGURA 15 - Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de Hidrólise de Óleo de Oliva por Ação da Lipase Pura de *Geotrichum sp.***



1- Trioleína  
 2- 1,3 Dioleína  
 3- 1,(2) Monoleína  
 4- Ácido Oleico

5- 0h de reação  
 6- Após 1/2h de reação  
 7- Após 1h de reação  
 8- Após 4h de reação  
 9- Após 8h de reação  
 10- Após 48h de reação

produzidas podem ser muito úteis na reestruturação de ácidos graxos insaturados dos triglicerídeos, na forma bruta, sem purificação.

#### 4.9.7.2 Hidrólise de vários substratos por lipase bruta de *Geotrichum sp.*

A hidrólise dos óleos de oliva, girassol, soja, milho e banha de porco por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp* foi realizada de acordo com o descrito no item 3.2.12.

A figura 16A ilustra as porcentagens de hidrólise obtidas sobre os diversos substratos por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp*. Como pode ser verificado, a maior porcentagem obtida de hidrólise foi sobre o óleo de girassol, com 35 % de hidrólise em 12 horas de reação, seguido pelo óleo de milho com 26 % em 6 horas aproximadamente. Vale ainda destacar que a hidrólise da banha de porco foi discreta, atingindo 16 % após 24 horas de reação.

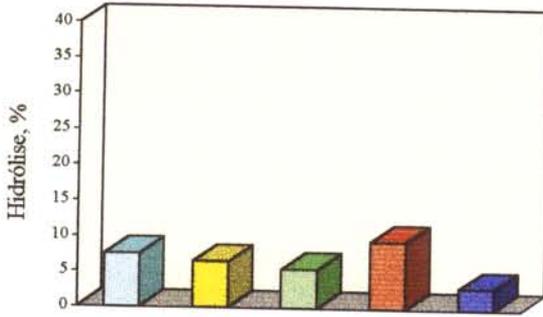
Todos os substratos testados possuem em sua composição os ácidos graxos oleico e linoleico, com atenção para os óleos de girassol e milho que possuem alta concentração de ácido linoleico e para a gordura de porco que, ao contrário, possui baixa concentração desses ácidos graxos insaturados, caracterizando-se como uma gordura saturada.

As figuras 16B e 16C ilustram a Cromatografia em Camada Delgada dos produtos de hidrólise dos vários substratos testados por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp* onde pode-se observar que houve intensa hidrólise dos óleos de girassol e milho, com produção de mono e diglicerídeos e ácidos graxos livres.

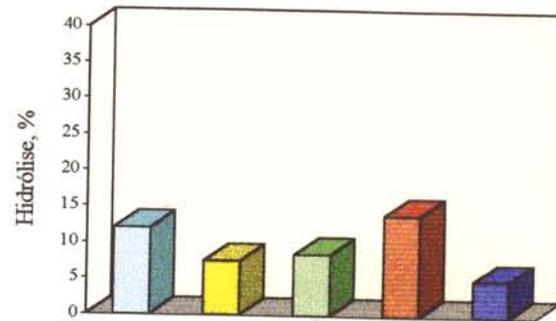
Alford e Pierce (1) compararam as atividades lipolíticas de lipases microbianas de *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium sp.* à baixa temperatura usando como substrato emulsões de óleo de milho, óleo de côco e toucinho. A taxa de lipólise dos substratos foi diretamente relacionada ao grau de insaturação dos mesmos. Foi observado que o óleo de côco foi o mais rapidamente atacado dentre os 3 substratos para todas as lipases, exceto a de *Geotrichum candidum*. A lipase produzida por este microrganismo foi a mais ativa em óleo de milho, e este efeito foi mais evidente à baixas temperaturas, mostrando a evidente preferência desta lipase por ácidos graxos insaturados, sendo que o ácido oleico e linoleico compõem cerca de 99 % dos ésteres de ácidos graxos hidrolisados por esta lipase.

**FIGURA 16 A - Porcentagem de hidrólise de vários substratos por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp***

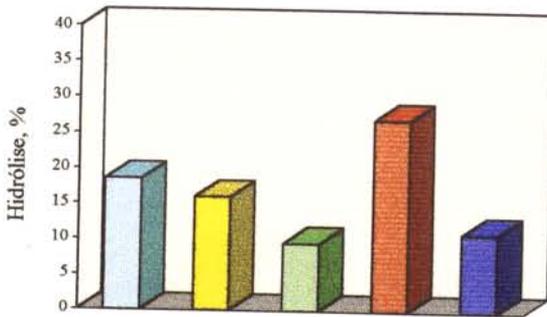
Hidrólise após 1 hora de reação



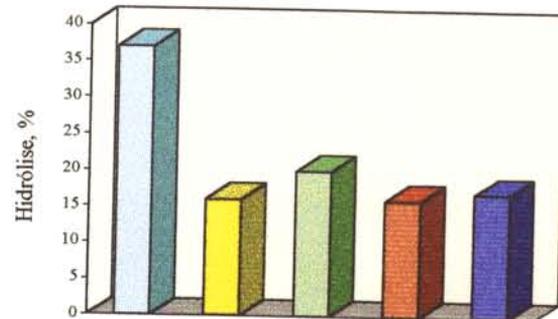
Hidrólise após 2 horas de reação



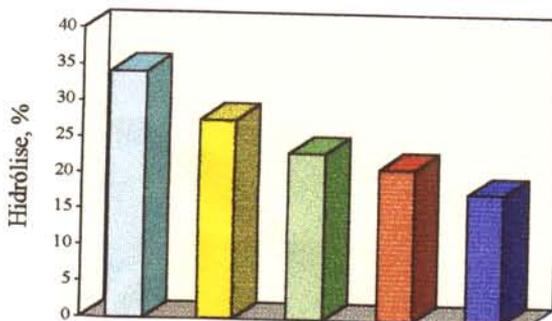
Hidrólise após 6 horas de reação



Hidrólise após 12 horas de reação



Hidrólise após 24 horas de reação



Legenda



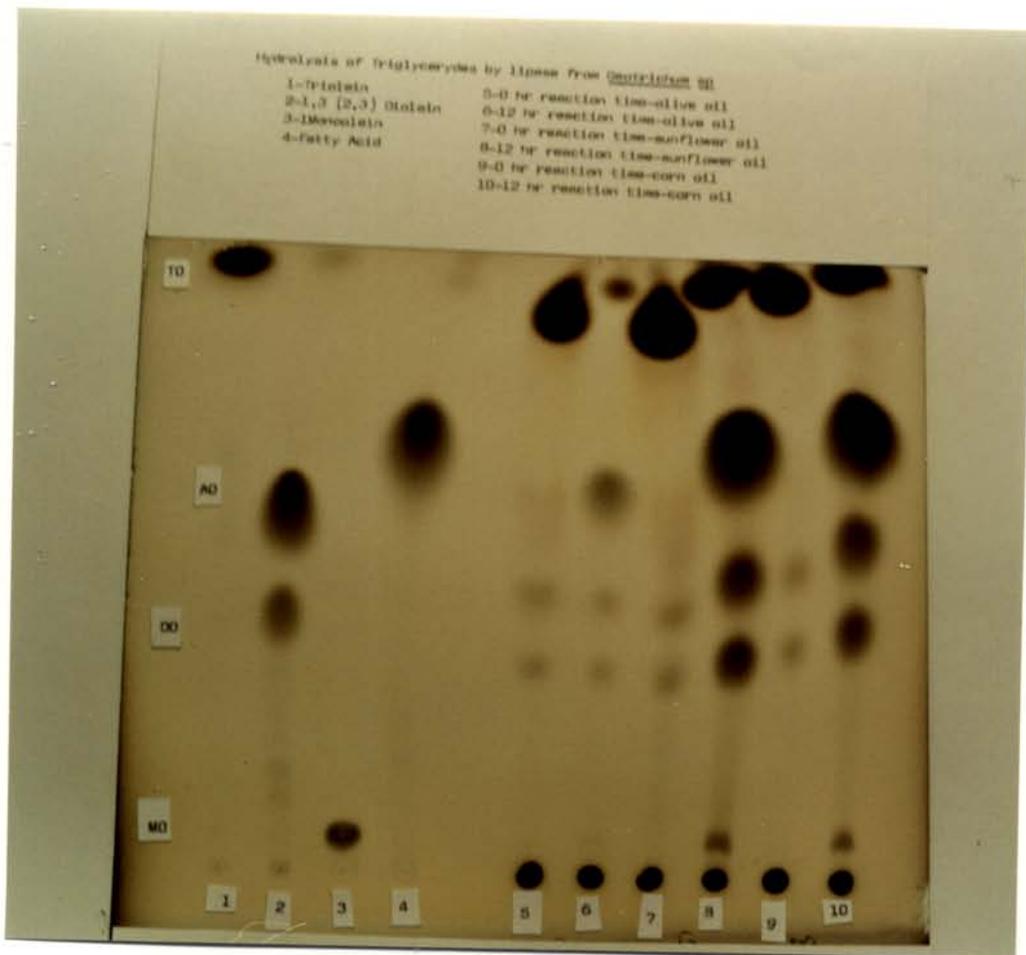
**FIGURA 16B - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Hidrólise de Vários Substratos por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp.***



- 1- Trioleína
- 2- 1,3 (2,3) Dioleína
- 3- Monoleína
- 4- Ácido Oleico

- 5- 0h de reação - Óleo de Oliva
- 6- Após 12h de reação - Óleo de Oliva
- 7- 0h de reação - Gordura de Porco
- 8- Após 12h de reação - Gordura de Porco
- 9- 0h de reação - Óleo de Soja
- 10- Após 12h de reação - Óleo de Soja

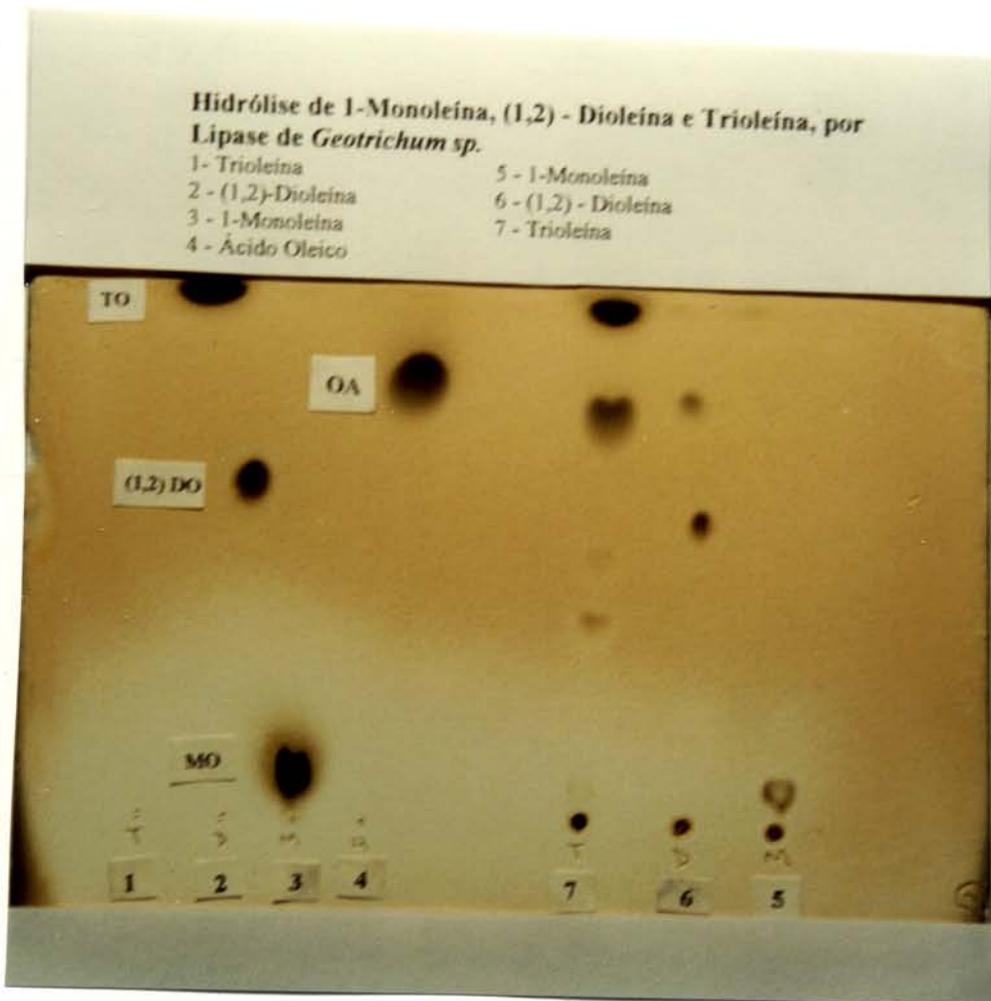
**FIGURA 16C - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Hidrólise de Vários Substratos por ação da lipase bruta de *Geotrichum sp.***



1- Trioleina  
2- 1,3 (2,3) Dioleina  
3- Monoleina  
4- Ácido Oleico

5- 0h de reação - Óleo de Oliva  
6- Após 12h de reação - Óleo de Oliva  
7- 0h de reação - Óleo de Girassol  
8- Após 12h de reação - Óleo de Girassol  
9- 0h de reação - Óleo de Milho  
10- Após 12h de reação - Óleo de Milho

**FIGURA 17 - Cromatografia em Camada Delgada dos Produtos de Hidrólise por ação da Lipase Bruta de *Geotrichum sp.***



1- Trioleína  
 2- 1,3 (2,3) Dioleína  
 3- Monoleína  
 4- Ácido Oleico

5- Monoleína  
 6- 1,3 (2,3) Dioleína  
 7- Trioleína

Linfield et alii (35) estudaram a cinética da hidrólise enzimática de óleo de oliva, óleo de côco e banha por lipase de *Candida rugosa*. Esta lipase foi selecionada por não apresentar especificidade e portanto, realizar a hidrólise completa de vários substratos. O óleo de oliva foi o melhor substrato para a lipase provavelmente devido à presença de ácidos graxos insaturados.

El-Sharkawy et alii (15) estudaram o modo de ação hidrolítica das lipases de *Saccharomyces cerevisiae* (UI - SACCH) e *Schizosaccharomyces octosporus* (NRRL 4-854). Os resultados experimentais mostraram que a lipase do primeiro cliva ácido palmítico nas seguintes posições de triglicerídeo : POP, OPO, OOP e SSP. Com base nisso, afirmou-se que esta lipase não é posicionalmente específica mas, ácido palmítico específica. Já a lipase do segundo catalisa a hidrólise de ácido esteárico nas posições: SSO, SSS e SSP, não hidrolisando OSO. Isso mostra que esta lipase é 1,3 específica, além de ácido esteárico específica.

#### 4.9.7.3 Estudo da especificidade posicional da lipase bruta de *Geotrichum sp.*

O estudo da especificidade posicional da lipase de *Geotrichum sp* foi realizado através da hidrólise de padrões de trioleína, dioleína e monoleína, de acordo com o descrito no item 3.2.17.

A figura 17 mostra a Cromatografia em Camada Delgada dos produtos obtidos pela ação da lipase bruta de *Geotrichum sp* onde pode-se observar que a lipase hidrolisa preferencialmente trioleína e dioleína.

Alford e Pierce (2) estudaram a atividade de lipase microbiana em gorduras naturais e triglicerídeos sintéticos. Os resultados concluíram que a lipase de *Geotrichum candidum* tem preferência por ácidos graxos insaturados independente de sua posição no triglicerídeo.

Okumura et alii (50) determinaram as especificidades posicionais de quatro espécies de lipases microbianas: *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Da ação destas enzimas sobre o substrato trioleína foi concluído que as lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* não hidrolisam a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo. Quando o substrato utilizado foi dioleína, estas duas lipases hidrolisaram 1,3 dioleína em preferência à 1,2 (2,3) dioleína. As lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* hidrolisam todas as ligações éster do triglicerídeo independentemente da posição.

Sugihara et alli (72) identificaram 4 formas (I , II, III, IV) da lipase de *Geotrichum candidum* isolada no próprio laboratório. A quarta fração da lipase de *Geotrichum candidum* jamais havia sido isolada antes, e mostrou preferência por hidrolisar ésteres na segunda posição do glicerol, característica não constatada em nenhum estudo posterior. Os estudos de especificidade realizados mostraram que a lipase IV hidrolisa a posição 2 do triglicerídeo duas vezes mais rápido que as demais posições.

#### **4.9.8 Determinação de carboidratos totais presentes na lipase de *Geotrichum sp.***

O teor de carboidratos totais presentes na lipase de *Geotrichum sp* foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (14), sendo encontrado o conteúdo de 4.6 % de carboidratos totais.

Tsujisaka et alii (77) estimaram o conteúdo de carboidratos da lipase purificada de *Geotrichum candidum* , encontrando o valor de 7.5 % de carboidratos como manose, parecendo ser este o principal componente dentre os açúcares detectados.

Baillargeon (8) isolou 2 lipases (A e B) de *Geotrichum candidum* e verificou que a lipase A continha 11.4 % de carboidratos totais e que as duas lipases possuem composição aminoacídica similar.

#### **4.10 Estudo da reação de esterificação pela lipase de *Geotrichum sp.***

O estudo da produção de ésteres através da esterificação de ácido graxo e glicerol foi realizado utilizando-se lipase de *Geotrichum sp* de acordo com o item 3.2.24.

O efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática foi estudado de acordo com o item descrito em 3.2.24.1. A figura 18 demonstra as porcentagens de esterificação obtidas nos experimentos.

A relação molar entre glicerol e ácido oleico que apresentou maior porcentagem de esterificação foi de 60 vezes mais glicerol que ácido oleico, com 63 % de esterificação após 15 minutos de reação a 40 °C. Convém ressaltar que as relações molares de 30 e 40 entre glicerol e ácido oleico mantiveram a porcentagem de esterificação constante após 2 horas de reação.

**FIGURA 18 - Efeito da proporção molar entre ácido oleico e glicerol no grau de esterificação enzimática**

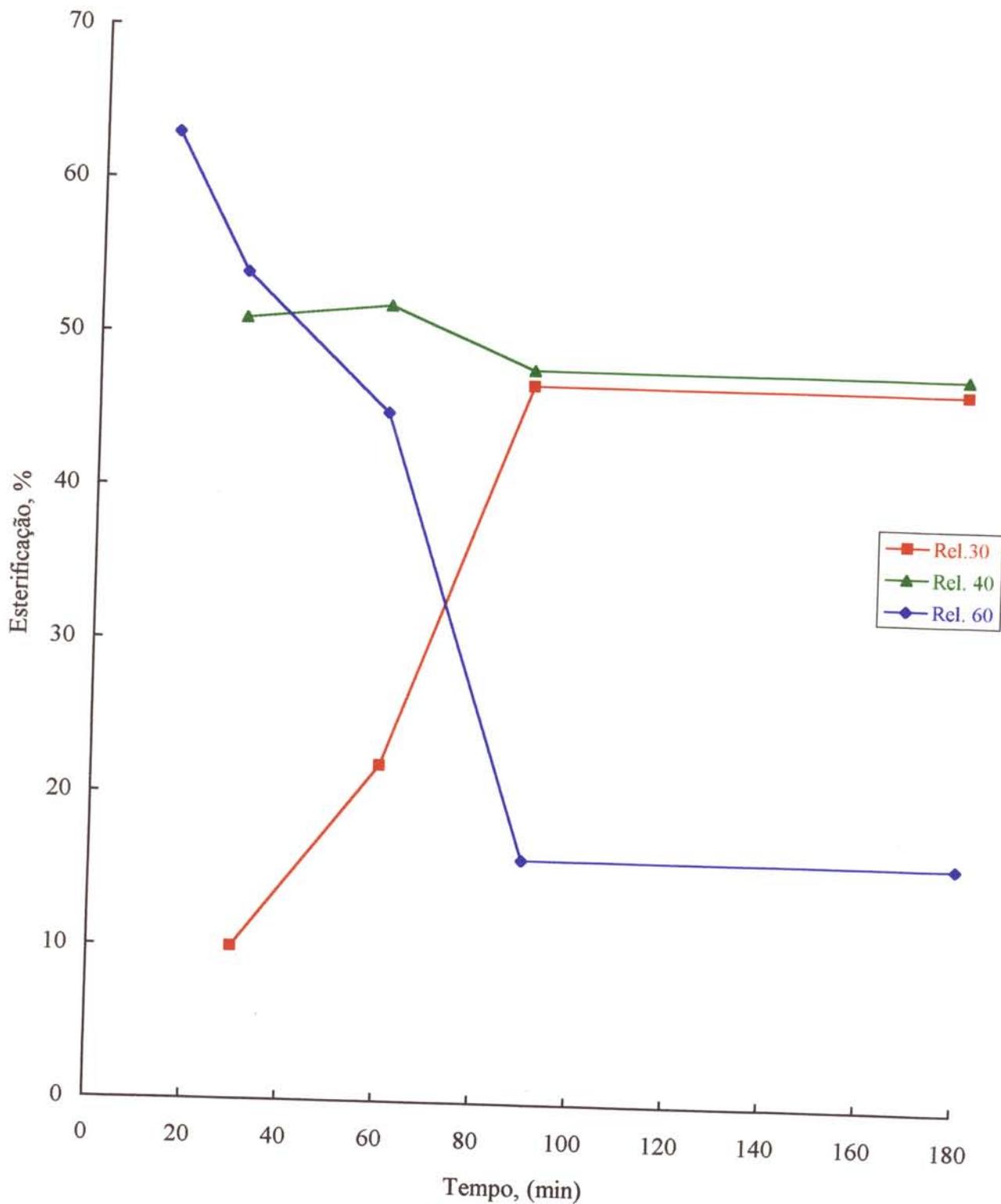


FIGURA 19 - Efeito da temperatura no grau de esterificação enzimática

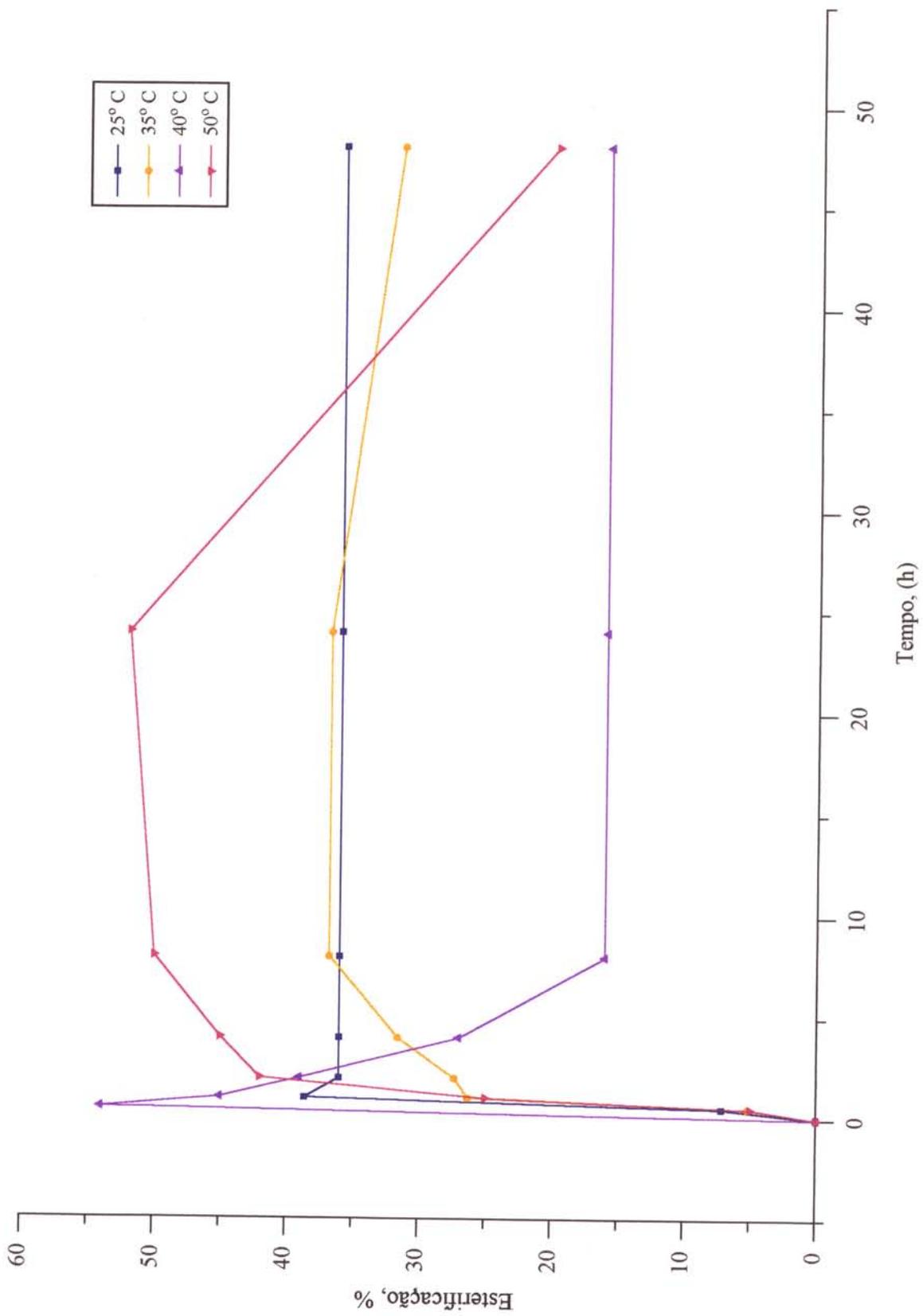
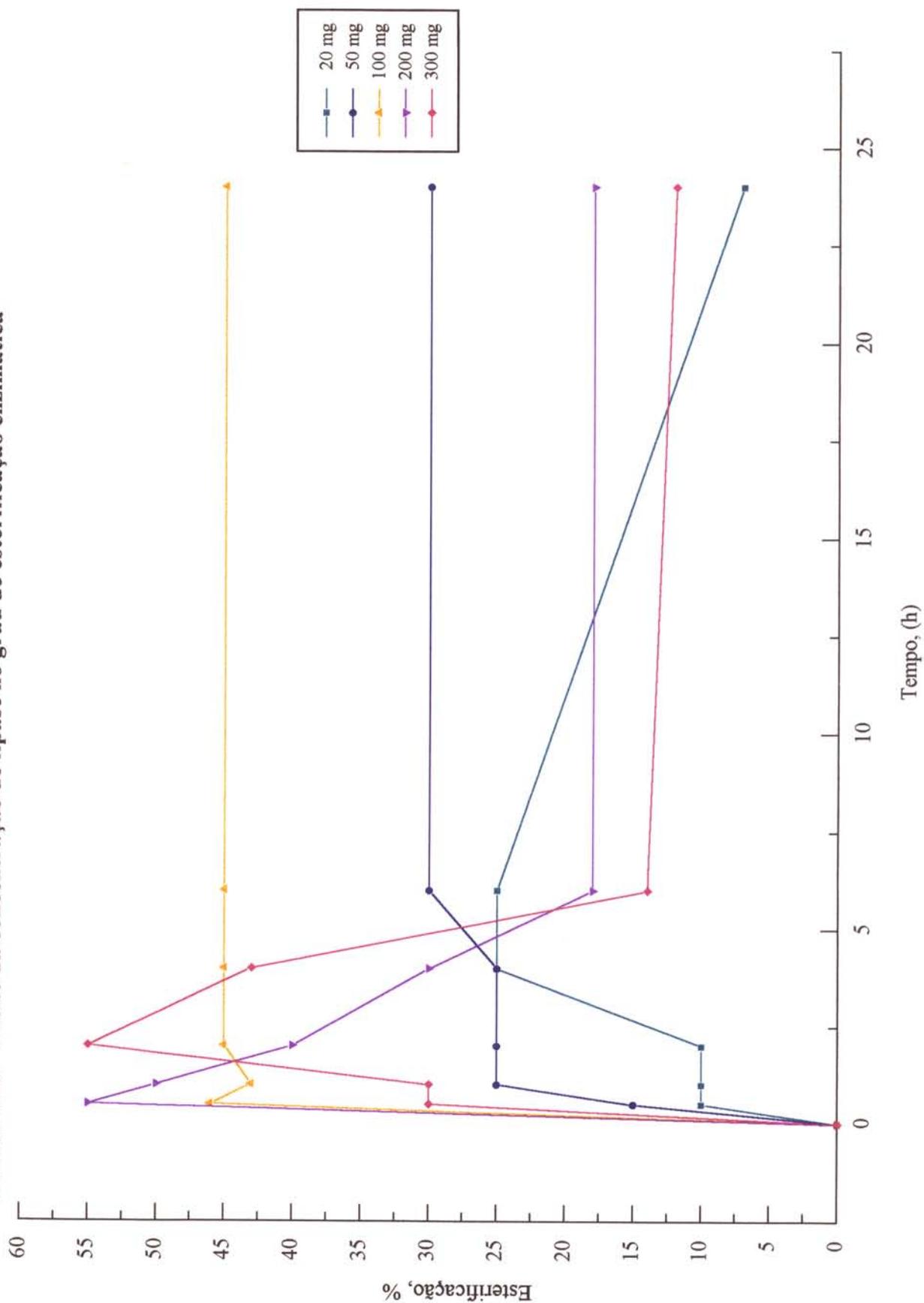


FIGURA 20 - Efeito da concentração de lipase no grau de esterificação enzimática



O efeito da temperatura no grau de esterificação enzimática foi estudado como descrito no item 3.2.24.2.

A figura 19 ilustra os resultados obtidos. Estes indicam que a 40 °C o grau de esterificação é máximo e chega a 55 % , e que a 50 °C a reação de esterificação se estabiliza em 50%.

O efeito da concentração da enzima no grau de esterificação enzimática foi realizado como descrito no item 3.2.24.3.

A figura 20 ilustra os resultados obtidos. O grau de esterificação é crescente com o aumento da concentração enzimática até 200 mg. No entanto, a diferença na porcentagem de esterificação entre as concentrações de 100 mg e 200 mg de enzima é muito pequena. A fim de se obter a formação de ésteres mais rapidamente, as concentrações de 100 a 200 mg de enzimas são melhores.

Okumura et alii (50) estudaram o efeito da ação reversa da lipase na hidrólise de triglicerídeos. Dentre outras lipases, a de *Geotrichum candidum* que hidrolisa ligações ester em todas as posições do glicerídeo, possui a pior performance na reação de esterificação dentre as lipases de *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Rhizopus delemar*.

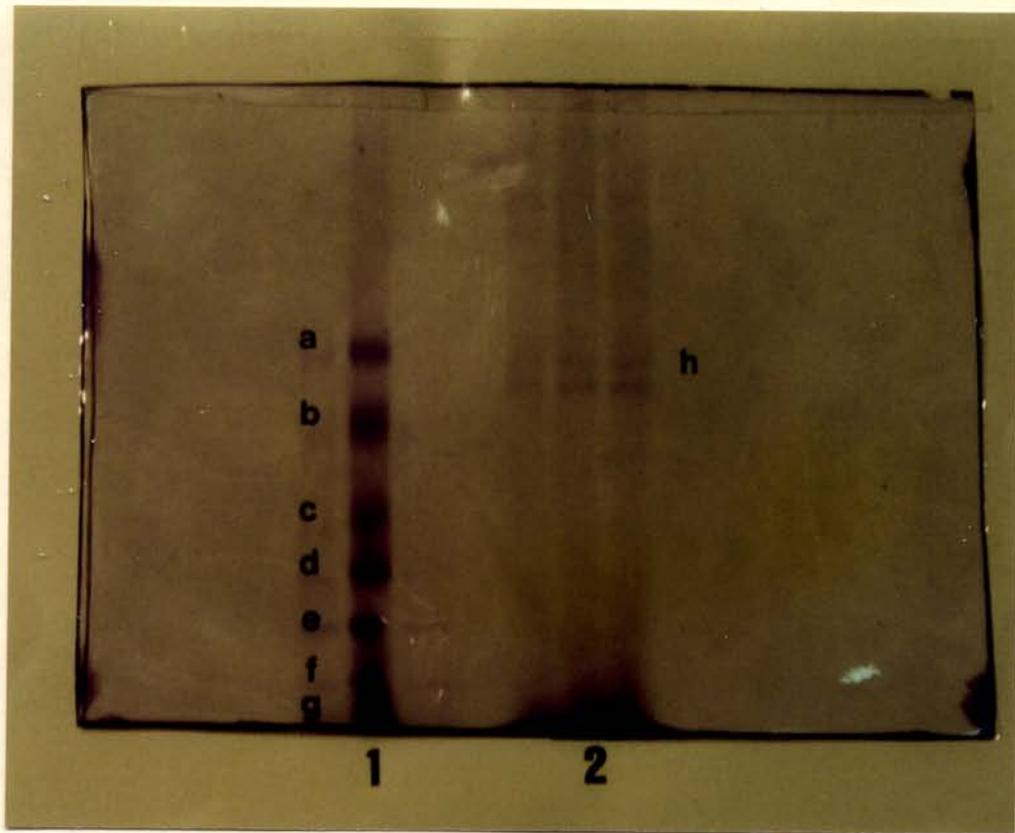
Akoh et alii (4) estudaram a produção de monoglicerídeos usando lipase G de *Penicillium sp* e lipase GC de *Geotrichum candidum* em hexano. A esterificação à 40 °C por 24 horas resultou 86.3 % e 64.3 % mol de incorporação de 18:1 n-9 e 20:5 n-3, respectivamente. A lipase GC não foi ativa na esterificação nessas condições experimentais. Lipase G foi capaz de incorporar 98.5 % mol e 98.1 % de 18: 1 n-9 em glicerol em 24 horas ou menos à 25 °C e 37° C. Os autores demonstraram que a lipase G é capaz de esterificar glicerol com ácido graxo de cadeia longa para produzir monoglicerídeos de ácido oleico enriquecido e EPA.

Pastore e Park (57) estudaram o efeito da proporção molar entre glicerol e ácido oleico no grau de esterificação enzimática para produção de monoleína, utilizando-se lipase de *Penicillium sp* .Verificaram que a maior porcentagem de esterificação foi encontrada quando a concentração de glicerol foi de 63.3 vezes maior que a concentração de ácido oleico no sistema.

#### **4.11 Determinação do peso Molecular por Eletroforese Vertical em Gel SDS - poliacrilamida da Lipase de *Geotrichum sp*.**

A eletroforese vertical em gel SDS da lipase de *Geotrichum sp* foi realizada de acordo com o item 3.2.25. A figura 21 mostra os resultados obtidos.

**FIGURA 21 - Eletroforese vertical em gel SDS - Poliacrilamida**



**1- Padrão de Proteínas**

- a- Albumina Bovina - 66000 daltons
- b- Albumina de Ovo - 45000 daltons
- c- Gliceraldeído 3-P-deidrogenase - 36000 daltons
- d- Anidrase Carbônica Bovina - 29000 daltons
- e- Tripsinogênio de Pâncreas Bovino - 24000 daltons
- f- Inibidor de Tripsina de soja - 20000 daltons
- g- Alfa Lactoalbumina de Leite Bovino - 14200 daltons

**2- Lipase de *Geotrichum sp.***

- h- 52000- 57000 daltons

A eletroforese em gel SDS demonstrou que a lipase de *Geotrichum sp* apresenta duas subunidades, com peso molecular de 52000 e 57000 daltons.

## 5. CONCLUSÕES

1. Das 700 linhagens isoladas e testadas a linhagem que apresentou maior atividade lipolítica foi identificada como *Geotrichum sp.*
2. *Geotrichum sp* produz lipase extracelular que hidrolisa ligação éster de triglicerídeos, diglicerídeos preferencialmente, liberando ácidos graxos e glicerol.
3. A produção máxima de enzima com 6 unidades de atividade por ml de centrifugado de meio de cultura foi obtida em meio de cultivo líquido composto por 1.0% de farinha de trigo, 1.5% de farinha de soja desengordurada, 0.2% de nitrato de amônio e 3% de extrato de levedura, após 48 horas de fermentação a 30 °C.
4. A enzima apresenta atividade ótima na faixa de pH entre 5.0 e 8.0, e é estável na faixa entre 5.0 e 9.0 . A temperatura ótima de atividade é de 45°C e após incubação a 50 °C por 1 hora retém 95% de sua atividade.
5. A lipase de *Geotrichum sp* foi fortemente inibida por AgNO<sub>3</sub> e CaCl<sub>2</sub> na concentração de 1mM no meio de reação. A enzima tem sua atividade acrescida em 45% na presença de MgSO<sub>4</sub> no meio de reação.
6. Verificou-se que a lipase de *Geotrichum sp* é menos afetada por inibidores enzimáticos na forma pura do que na forma bruta. A enzima não parece ser dependente das ligações S-S para exercer sua atividade catalítica.
7. A eletroforese vertical em gel SDS- Poliacrilamida da lipase de *Geotrichum sp* mostrou que a fração purificada da enzima apresenta duas subunidades.
8. O peso molecular de cada subunidade da lipase purificada de *Geotrichum sp* foi estimado em 52000 e 57000 daltons.
9. A enzima de *Geotrichum sp* atua preferencialmente em ácidos graxos de cadeia longa e insaturados.
10. Na reação de esterificação pela lipase *Geotrichum sp* , verificou-se que as condições ótimas da reação são : Relação molar de 60 entre

glicerol e ácido oleico; a temperatura ideal está entre 40 e 50 °C. A enzima esterifica 63 % de ácido oleico em glicerol em 30 minutos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A.; SUGGS, F.G. Activity of microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. Journal of Lipid Research, v. 5, 390-394, 1964.
3. ANTONIAN, E. Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. Lipids, v. 23, n.12, p. 1101-1106, 1988.
4. AKOH, C.C.; COOPER, C.; NWOSU, C.V. Lipase g-catalyzed synthesis of monoglycerides in organic solvent and analysis by HPLC. J.A.O.C.S. v.69, n. 3, p. 257-260, 1992.
5. AKTHAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; CHUGTAI, M.D. Lipase induction in *Mucor hiemalis*. Applied and Enviromental Microbiology, v.40, n.2, p. 257-63, 1980.
6. BAILLARGEON, M.W.; SONNET, P.E. Polyethylene glycol modification of *Candida rugosa* lipase. J.A.O.C.S., v. 65, n.11, p. 1812-1815, 1988.
7. BAILLARGEON, M. W. ; BISTLINE, R.G.; SONNET, P. E. Evaluation of strains of *Geotrichum candidum* for lipase production and fatty acid specificity. Appl. Microb. Biotechnol., v.30, p. 92-96, 1989.
8. BAILLARGEON, M.W. Purification and specificity of lipases from *Geotrichum candidum* . Lipids, v. 25, n. 12, p. 841-848, 1990.
9. BAILLARGEON, M.W.; McCARTHY, S.G. *Geotrichum candidum* NRRL Y-553 lipase: Purification, characterization and fatty acid specificity. Lipids, v.26, n.10, p.831-836, 1991.

10. BAILLARGEON, M.W.; SONNET, F.P. Selective lipid hydrolysis by *Geotrichum candidum* NRRL Y- 553 Lipase. Biotechnology Letters v. 13,n.12,p. 871-874, 1991
11. BARNETT, J. A.; PAYNE, R.W. & YARROW, D. Yeasts characteristics and identification. Cambridge University Press, 1983.
12. CHEN, J. et all. Lipase Production by *Trichosporon fermentans* WU-C12, a newly isolated yeast. J. Fermentation and Bioengineering, v. 73,n.5,p. 412-414, 1992.
13. CUTCHINS,E.C.; DOESTSCH,R.N.; PELCZAR,J.Jr. The influence of medium composition on the production of bacterial lipase. Journal of Bacteriology,v.63,p.269, 1952
14. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, T. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry,v.28,p.350, 1956.
15. EL-SHARKAWY, S.H.; DOSTAL, L.; ROSAZZA, J.P.N. Microbial transformations of lipids : Acyl-specific hydrolysis of lard by yeasts. Appl. Environ. Microbiol.,v.59, n.3, p. 725-728, 1993.
16. ESPINOSA, E.; SÁNCHEZ,S.; FARRÉS,A. Nutricional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. Biotechnology Letters, v.12,n.3,p.209-214, 1990.
17. FUJII, T.; TATARA, T. ; MINAGAWA, M. Studies on applications of lipolytic enzyme in Detergency I. Effect of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. J.A.O.C.S. v. 63,n. 6, p.796-799, 1986.
18. GELUK,M.A.; NORDE,H.K.; VAN KALSBECK, H.K.A.I.; RIET, K.V. Adsorption of lipase from *Candida rugosa* on cellulose and its influence on lipolytic activity. Enzyme Microb. Technol. , v. 14,p.748-754, 1992.
19. GOMI,K.; OTA,Y.; MINODA,Y. Isolation and identification of lipase activators from *Saccharomycopsis lipolytica*. Agr. Biol. Chem.v. 50, n.10,p. 2525-2530, 1986.

20. HOU C.T.; JOHNSTON, T.M. Screening of lipase activities with cultures from the agricultural Research Service Culture Collection . J.A.O.C.S. v.69,n.11, 1992.
21. HUANG, K. & AKOH, C.C. Lipase - catalyzed Incorporation of n-3 polynsaturated fatty acids into vegetable oils. J. A. O. C. S.; v.71,n.11, p. 1277-1280, 1994.
22. IIZUMI,T.; NAKAMURA,K.;FUKASE,T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas sp.* KWI-56. Agric. Biol. Chem. v.54,n. 5,p. 1253-1258, 1990.
23. ITSUKA, H. & KOTO, S. Identification methods of yeasts. University Tokio Press, 1969.
24. IWAI,M.; TSUJISAKA,Y.;OKAMOTO, Y. ; FUKUMOTO, J. Lipid Requirement for the lipase production by *Geotrichum candidum* Link. Agr. Biol. Chem.,v. 37,n. 4,p. 929-931, 1973.
25. JACOBSEN, T.; JENSEN, B.; OLSEN, J.; ALLERMANN, K. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum* . Applied Microbiology and Biotechnology, v. 32,p. 256-261, 1989.
26. JACOBSEN, T.; OLSEN, J.; ALLERMAN, K. Production, partial purification and immunochemical characterization of multiple forms of lipase from *Geotrichum candidum*. Enzyme Microbiology and Technology, v. 11, n.2, p. 90-95, 1989.
27. JACOBSEN,T. ; OLSEN, J. ; ALLERMAN, K. Substrate specificity of *Geotrichum candidum* lipase preparations. Biotechnology Letters, v. 12, n. 2,p.121-126, 1990
28. JENSEN,R.G.; DUTHIE,A.H.; GANDER,G.W.; MORGAN, M.E. Some evidence supporting the specificity of milk lipases for the primary hydroxil positions of milk glycerides. Journal of Dairy Science,v. 43, n. 1,p. 96-99, 1960.

29. JENSEN , R.G.; SAPUGNA, J.; QUINN,J.G.; CARPENTER, D.L.; MARKS, T.A. Specificity of a lipase from *Geotrichum candidum* for cis-octadenoic acid. J.A.O.C.S. ; v.42,p.1029-1032, 1965.
30. JENSEN, R.G.; Symposium : Characteristics of the lipase from the mold *Geotrichum candidum*: a review. Lipids, v. 9, n. 3, 1974.
31. JENSEN,R.G.; Detection and determination of lipase activity from various Sources. Lipids, v. 18, n. 9,p. 650-657, 1983.
32. JENSEN,R.G.; DEJONG, F.A.; CLARK ,R.M. Determination of lipase specificity. Lipids, v. 18, n.3,p.239-252, 1983.
33. KWON, D.Y.; RHEE, J.S. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. J.A.O.C.S.,v. 63, n. 1, 89-92, 1986.
34. LAVAYRE,J.; BARATTI,J. Preparation and properties of immobilized lipases. Biotechnology and Bioengineering, v. 24,p.1007-1013, 1982.
35. LINFIELD,W.M.; O'BRIEN,D.J.; SEROTA,S.; BARAUSKAS,R. Lipid-lipase interaction fat splitting with lipase from *Candida rugosa*. J.A.O.C.S., v. 61,n.6,p.1067-1074, 1984.
- 36.LINFIELD,W.M.; SEROTA,S.; SIVIERI,L. Lipid-lipase interactions.II A new method for the assay of lipase activity. J.A.O.C.S. ,v. 62,n. 7,p. 1152- 1154, 1985.
37. LOWRY,O. H.; ROSEBROUGH,A. L. F.; RANDALL, R. F. Protein measurement with the Folin - phenol reagent. Journal of Biological Chemistry,v. 193,p.265-275, 1951.
38. LU,J.Y.; LISKA,B.J. Lipase from *Pseudomonas fragi*.I. Purification of the enzyme. Applied Microbiology, v. 18,n.1,p. 104-107, 1969.
39. MACRAE,A.R. Lipase -catalyzed interesterification of oils and fats. J.A.O.C.S., v.60, n.2,p. 291-294, 1983.

40. MALISZEWSKA, I; WIEEZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. Enzyme Microb. Technol., v.10, p.492-497, 1988.
41. MARKS, T.A.; QUINN, J.G.; SAPUGNA,J.; JENSEN, R.G. Studies on the specificity of a lipase system from *Geotrichum candidum*. Lipids, v.3, n.2, p.143-146, 1968.
42. MONTERO, S.; BLANCO,A.; VIRTO, M.D.; LANDETA, L.C.; AGUD, I.; ET ALII. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. Enzyme Microb. Technol. v.15, p. 239-247, 1993.
43. MOZAFFAR, Z.; WEETE, J. D. ; DUTE, R. Influence of surfactants on a extracellular lipase from *Pythium ultimum*. J.A.O.C.S., v. 71, n.1,p. 75-79, 1994.
44. MUDERWA, J.M.; RATOMAHENINA, R.; PINA, M.; GRAILLE, J.; GALZY, P. Purification and properties of the lipase from *Rhodotorula pilimanae* Hedrick and Burke. Applied Microb. Biotech., v.23,p. 348-354, 1986.
45. MUÑOZ, R.G.; TINOCO, V.J.R.; SANCHEZ, J.R.; FARRÉS, A. Production of Microbial Lipases in a Solid State Fermentation System. Biotechnology Letters, v. 13,n. 4,p. 277-280, 1991.
46. NAGAOKA,A.; YAMADA,Y.; KOAZE,Y. Studies on *Mucor* lipase. Part 1 . Production of lipases with a newly isolated *Mucor sp.* Agr. Biol. Chem.,v. 33, n.3 ,p. 299-305, 1969.
47. 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.
48. NISHIO,T.; CHIKANO,T.; KAMIMURA,M. Purification and Some Properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. Agr. Biol. Chem. v.51, n. 1,p. 181-186, 1988.
49. OHRNER, N.; MARTINELLE, M.; MATTSON,A.; NORIN,T.; HULT, K.; Displacement of the equilibrium in lipase catalysed transesterification

in ethyl octanoate by continuous evaporation of ethanol. Biotechnology Letters, v. 14, n. 4, p.263-268, 1992.

50. OKUMURA,S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. Agr. Biol. Chem. v. 40, n. 4,p. 655-660, 1976
51. OKUMURA,S.; IWAI,M.; TSUJISAKA,Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase . Agr. Biol. Chem. v. 45, n. 1,p. 185-89, 1981.
52. ONIONS, A. H. S. ; ALLSOPP, D. & EGGINS, H. O. W. Introduction to industrial mycology. Edward (publishers) Ltd, 1981.
53. OTA, Y.; MIYAIRI,S. ; YAMADA,K. Sterol Requirement for the lipase production by *Candida cylindracea*. Agr. Biol. Chem. v. 32, n.12, p.1476-1478, 1968.
54. OTA,Y.; SUZUKI,M.;YAMADA,K. Lipids and related substances inducing the lipase production by *Candida parapolytica*. Agr. Biol. Chem. v. 32, n. 3, p. 390-391, 1968.
55. 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.
56. PARK,Y.K.; PASTORE,G.M.; ALMEIDA, M.M. Hydrolysis of soybean oil by combined lipase system . J.A.O.C.S. v. 65, n. 2, p. 252-254, 1988.
57. PASTORE, G.M. ; PARK, Y.K.. Produção de Monoleína por Lipase Microbiana . Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 13, n. 1, p. 13-21, 1993.
58. PENICK,S. and KNEZ,Z. Enzymatic Fatty Ester Synthesis . J.A.O.C.S. , v. 69, n. 3, p. 261-165, 1992.
- 59.PETROVIC, S. E.; SKRINJAR, M.; BECAREVIC,A.;VUJIOTO,I.F.; BANKA, L. Biotechnology Letters, v. 12, n. 4, p. 299-304, 1990.

60. PHILIPS, A.; PRETORIUS, G.H.J. Purification and characterization of an extracellular lipase of *Galactomyces geotrichum*. Biotechnology Letters, v. 13, n. 11, p. 833-838, 1991.
61. POSORSKE, L.H. Industrial -scale application of enzymes to the fats and oils industry. J.A.O.C.S. v. 61, n. 11, 1984
62. RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. Enzyme Microb. Technol., v. 14, p. 938-943, 1992.
63. RIAUBLANC, A.; RATOMAHENINA, R.; GALZY, P. NICOLAS, M. Peculiar properties of lipase from *Candida parapsilosis* ( Ashford) Langeron and Talice. J.A.O.C.S., v. 70, n. 5, p. 497-500, 1993.
64. RIVERA-MUNÓZ, 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.
65. SEITZ, E.W.; Industrial application of microbial lipases: A Review. J.A.O.C.S., v. 51, p.12-16, 1974.
66. SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y.. Induction of *Geotrichum candidum* Lipase by Long-Chain Fatty Acids. J. Fermentation and Bioengineering, v. 74, n. 2, p. 77-80, 1992.
67. SIDEBOTTOM, C.M.; CHARTON, E.; DUNN, P.P. J.; MYCOCK, G.; DAVIES, C.; SUTTON, J.L.; MACRAE, A.R.; SLABAS, A. R. *Geotrichum candidum* produces several lipases with markedly different substrate specificities. European Journal Biochem. v. 202, p.485-491, 1991
68. SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antoine van Leenwenhock, v. 23, n.1, p.15-22, 1957
69. SOHN, S.H.; CHUNG, S.S.; RHEE, J.S. Deactivation of *Candida rugosa* lipase. Biotechnology Letters, v. 9, n. 2, p. 117-122, 1987

70. SONNET, E.P.; FOGLIA, T.A.; BAILLARGEON, M.W.; Fatty acid selectivity : The selectivity of lipase of *Geotrichum candidum* . J.A.O.C.S. v. 70, n.10,p. 1043-1045, 1993.
71. SUGIHARA,A.; SHIMADA Y.; TOMINAGA, Y. Separation and Characterization of two Molecular Forms of *Geotrichum candidum* Lipase. J. Biochem. v. 107, p. 426-430, 1990.
72. SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2-position on a triglyceride molecule. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 35, p. 738-740, 1991.
73. TAHOUN,M.K.; MOSTAFA,E.; MASHALY R.; ABOU-DONIA,S. Lipase induction in *Geotrichum candidum*. Milchwissenschaft . v. 37, n. 2, p.86-88, 1982.
74. TAIPA,M.A.; AIRES-BARROS, M.R., CABRAL, J.M.S. Purification of Lipases. Journal of Biotechnology, v. 26, p.111-142,1992.
- 75.TANAKA, T., et alii, Enzymatic acyl exchange of triglyceride in n-hexane. Agr. Biol. Chem., v. 45,n. 10, p. 2387-2389, 1981.
76. TSUJISAKA,Y.; IWAI,M.;TOMINAGA, Y. A comparative study on some properties of fungal lipases. Proceedings of IV International Fermentation Symposium : p. 315-320, 1972.
77. TSUJISAKA,Y.; IWAI,M.;TOMINAGA, Y. Purification, Crystallization and Properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. Agr. Biol. Chem. v. 37, n. 6, p. 1457-1464, 1973.
78. TSUJISAKA, Y.; OKUMURA,S.; IWAI, M.; Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase . Biochimica et Biophysica Acta, v. 489, p.415-422, 1977.
79. VEERARAGAVAN, K.; GIBBS, B.F. Detection and partial purification of two lipases from *Candida rugosa* . Biotechnology Letters, v. 11, n. 5,p. : 345-348, 1989.

80. VIRTO, M. et alii. Hydrolysis of animal fats by immobilized *Candida rugosa* lipase; Enzyme Microb. Technol., v. 16,p. 61-65, 1994.
81. VORDERMULBECKE,T. KIESLICH,K.; ERDMANN,H.; Comparison of lipases by different assays .Enzyme Microb. Technol., v. 14, p. 631-639, 1992.
82. WATANABE,N.; OTA,Y. MINODA, Y.; YAMADA,K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes . Agr. Biol. Chem.,v. 41, n. 8, p. 1353-1358, 1977.
83. YAMAGUCHI, T.; MUROYA, N.; ISOBE,M.; SUGIURA,M. Production and properties of lipase from a Newly isolated *Chromobacterium*. Agr. Biol. Chem., v. 37, n.5,p. 999-1005, 1973.
84. YANG, D.; RHEE, J. S.. Stability of lipase immobilized on DEAE-Sephadex for continuous lipid hydrolysis in organic solvent. Biotechnology Letters, v. 13, n. 8, p.553-558, 1991.