

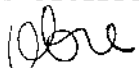
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

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

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ROSELI DE SOUSA NETO e aprovada pela Comissão Julgadora em 23.10.96.

Campinas, 23 de outubro de 1996


Profa. Dra. GLÁUCIA M. PASTORE

Presidente da Banca

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

Roseli de Sousa Neto
Bióloga

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore
Orientadora

1996

1996

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

S384p

Neto, Roseli de Sousa

Produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicações da lipase de *Alcaligenes sp.* / Roseli de Sousa Neto. --Campinas, SP: [s.n.], 1996.

Orientador: Gláucia Maria Pastore

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Lipase. 2.Alcaligenes sp. 3.Bioquímica - purificação.
4.Microorganismo. I.Pastore, Gláucia Maria. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	So 85 p
V.	Ex.
PROCESSO	BO/29288
PROC.	667/96
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/12/96
CPD	

CM-00095399-5

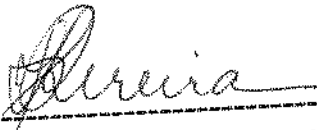
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
(orientadora)



Prof. Dr. Roberto da Silva
(membro)



Prof. Dr. José Luís Pereira
(membro)

Profa. Dra. Lireny A. G. Gonçalves
(membro)

Campinas, de de 1996.

*Aos meus Pais,
irmãos e sobrinhos
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore pela valiosa e dedicada orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Lireny A. G. Gonçalves, Roberto da Silva e José Luís Pereira pelo auxílio e dedicada atenção na redação final deste trabalho.

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

À Margareth e Cristiane da Secretaria de Pós Graduação pela dedicada atenção.

Aos funcionários da Biblioteca da FEA pelo auxílio, atenção e amizade.

À Eliana Chagas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Biologia da Unicamp pela inestimável colaboração.

À Daniela Franco Carvalho do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos pelo auxílio e amizade.

Aos amigos Alessandra, Valéria, Maricilda, Chico, Marjorie, Franceli, Marquinhos, Valéria Luciano, Luis Antônio e Felipe, pelo auxílio e dedicada atenção.

Aos amigos e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	ix
SUMMARY.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
 3.1 Material.....	 35
 3.2 Métodos.....	 38
3.2.1 Isolamento de microrganismo.....	38
3.2.2 Pré seleção de microrganismos.....	39
3.2.2.1 Preparo da suspensão bacteriana.....	39
3.2.2.2 Fermentação Líquida.....	39
3.2.3 Seleção de linhagens produtoras de lipase.....	39
3.2.4 Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica de <i>Alcaligenes sp.</i> linhagem 212 e conservação da cultura.....	40
3.2.5 Estudo do sistema de reação para a determinação da atividade lipolítica.....	40
3.2.5.1 Determinação da atividade lipolítica utilizando goma arábica.....	41
3.2.5.2 Determinação da atividade lipolítica utilizando desoxicolato de sódio.....	41
3.2.5.3 Determinação da atividade lipolítica sem emulsificante.....	41
3.2.5.4 Determinação da atividade lipolítica utilizando-se álcool polivinílico como emulsificante.....	42
3.2.6 Estudos de parâmetros para a produção de lipase alcalina da linhagem nº 212, selecionada como melhor produtora.....	42
3.2.6.1 Seleção do melhor meio de cultivo para a produção de lipase.....	42
3.2.6.2 Estudo da relação entre temperatura, tempo de incubação e produção da lipase.....	44
3.2.6.3 Estudo do efeito de ácidos graxos na produção de lipase da linhagem de <i>Alcaligenes sp.</i>	45
3.2.6.4 Estudos da fonte de carbono na produção da lipase.....	45
3.2.6.4.1 Triglicerídeos.....	45
3.2.6.4.2 Carboidratos.....	46
3.2.6.5 Estudo da fonte de nitrogênio na produção de lipase.....	46

3.2.7 Produção da Lipase Alcalina Bruta.....	47
3.2.8 Determinação da atividade lipolítica.....	47
3.2.9 Fracionamento com Sulfato de Amônio	48
3.2.10 Caracterização Bioquímica da Lipase Bruta Produzida por <i>Alcaligenes</i> <i>sp.</i>	49
3.2.10.1 Efeito do pH na atividade enzimática	49
3.2.10.2 Efeito do pH na estabilidade da lipase.....	49
3.2.10.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	50
3.2.10.4 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.....	50
3.2.10.5 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de oliva pela lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	50
3.2.10.6 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase alcalina de <i>Alcaligenes sp.</i> em diferentes substrato.....	51
3.2.10.6.1 Determinação do n° de saponificação	52
3.2.10.6.2 Cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise enzimática.....	52
3.2.10.7 Estudo do efeito de detergentes na atividade enzimática.....	53
3.2.10.7.1 Estudo do efeito de detergentes na atividade lipolítica de <i>Alcaligenes sp.</i> e lipase comercial.....	53
3.2.10.7.2 Estudo do efeito de protease na ação enzimática da lipase de <i>Alcaligenes sp.</i> e lipase comercial.....	54
3.2.10.7.3 Efeito da temperatura na atividade da lipase comercial e lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	54
3.2.10.7.4 Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	54
3.2.10.7.5 Estudo da ação hidrolítica das lipases de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial em tecido de algodão impregnado com óleo de oliva.....	55
3.2.10.8 Efeito de sais minerais na atividade enzimática de <i>Alcaligenes</i> <i>sp.</i>	55
3.2.10.8.1 Estudo do efeito de CaCl ₂ e MgSO ₄ na atividade enzimática.....	56
3.2.10.9 Efeito de inibidores na atividade enzimática de <i>Alcaligenes sp.</i>	56
3.2.10.10 Estudo da ação hidrolítica da lipase alcalina quanto ao tipo de ácido graxo no triglicerídeo.....	57
3.2.11 Estudo da ação de esterificação da lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	57
3.2.12 Purificação da lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	58
3.2.12.1 Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	58
3.2.12.2 Cromatografia de Troca Iônica em coluna de DEAE Sephadex A- 50.....	58

3.2.13 Caracterização bioquímica da lipase purificada de <i>Alcaligenes sp.</i>	59
3.2.13.1 Efeito do pH.....	59
3.2.13.1.1 Determinação do pH ótimo de atividade.....	59
3.2.13.1.2 Determinação do pH de estabilidade.....	59
3.2.13.2 Efeito da temperatura.....	60
3.2.13.2.1 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática.....	60
3.2.13.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.....	60
3.2.13.3 Efeito de sais minerais na atividade da lipase purificada.....	60
3.2.13.4 Efeito de inibidores na atividade da lipase purificada.....	61
3.2.13.5 Hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase purificada.....	61
3.2.13.6 Determinação do teor de açúcares totais na lipase purificada.....	62
3.2.13.7 Determinação do peso molecular das frações I e II da lipase purificada por eletroforese em gel SDS PAGE.....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1 Seleção Preliminar de microrganismos.....	63
4.1.2 Seleção de microrganismo produtor de lipase alcalina.....	63
4.2 Estudo do sistema de reação para a determinação da atividade lipolítica.....	64
4.3 Identificação da linhagem produtora de lipase alcalina.....	65
4.4 Estudos dos parâmetros para a produção da enzima pela linhagem 212, selecionada como melhor produtora de lipase alcalina.....	68
4.4.1 Seleção do meio de cultivo para a produção da lipase.....	68
4.4.2 Estudo da relação entre temperatura, tempo de incubação e produção da lipase.....	69
4.4.3 Estudo do efeito de ácidos graxos na produção de lipase alcalina	71
4.4.4 Estudo da fonte de carbono na produção de lipase alcalina.....	73
4.4.4.1 Triglicerídeos.....	73
4.4.4.2 Carboidratos.....	74
4.4.5 Estudo da fonte de nitrogênio na produção da lipase.....	76
4.5 Caracterização bioquímica da lipase bruta produzida por <i>Alcaligenes sp.</i> ...	77
4.5.1 Estudo do efeito do pH na atividade da lipase.....	77
4.5.2 Estudo do efeito pH na estabilidade da lipase.....	78
4.5.3 Estudo do efeito da temperatura na atividade da lipase.....	79
4.5.4 Estudo do efeito da temperatura na estabilidade da lipase.....	80
4.5.5 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de oliva pela lipase.....	81

4.5.6 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase alcalina.....	84
4.5.7 Estudo do efeito de sais minerais na atividade enzimática.....	87
4.5.8 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise em óleo de oliva na presença de íons de Ca^{++} e Mg^{++}	88
4.5.9 Efeito de inibidores na atividade da lipase.....	90
4.5.10 Estudo da ação hidrolítica da lipase alcalina quanto ao tipo de ácido graxo no triglicerídeo.....	91
4.5.11 Estudo da ação de esterificação da lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	92
4.5.12 Purificação da lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	94
4.5.13 Caracterização da lipase purificada.....	98
4.5.13.1 Efeito do pH na atividade enzimática.....	98
4.5.13.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática.....	99
4.5.13.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática.....	100
4.5.13.4 Efeito da temperatura na estabilidade enzimática.....	101
4.5.13.5 Efeito de sais minerais na atividade enzimática das frações I e II.....	103
4.5.13.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática das frações I e II....	105
4.5.13.7 Hidrólise de óleo de oliva por ação lipolítica das frações I e II....	106
4.5.13.8 Determinação dos açúcares totais nas frações I e II da lipase purificada.....	109
4.5.13.9 Determinação do peso molecular por eletroforese Vertical em gel SDS PAGE das frações I e II da lipase purificada de <i>Alcaligenes sp</i>	110

5. APLICAÇÕES.....	112
5.1 Estudo do efeito de detergentes na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	114
5.2 Comparação do efeito de detergentes na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	115
5.3 Estudo do efeito de protease na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	116
5.4 Efeito da temperatura na atividade das lipases de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	118
5.5 Efeito do pH na atividade das lipases de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	118
5.6 Ação das lipases de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial na remoção de óleo de oliva em tecido de algodão.....	120
6. CONCLUSÕES.....	123
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Atividade lipolítica alcalina dos microrganismos selecionados	63
Tabela 2 - Atividade lipolítica nos diferentes sistemas de reações.....	64
Tabela 3 - Características morfológicas e bioquímicas da linhagem de <i>Alcaligenes sp.</i>	67
Tabela 4- Efeito de sais minerais na atividade da lipase bruta de <i>Alcaligenes sp.</i>	87
Tabela 5 - Efeito de inibidoresde enzimas na atividade da lipase bruta de <i>Alcaligenes sp.</i>	90
Tabela 6 - Purificação da lipase de <i>Alcaligenes sp.</i>	97
Tabela 7A - Efeito de sais minerais na atividade lipolítica da fração I.....	103
Tabela 7B - Efeito de sais minerais na atividade lipolítica da fração II.....	104
Tabela 8A - Efeito de inibidores na atividade enzimática da fração I.....	105
Tabela 8B - Efeito de inibidores na atividade enzimática da fração II	105
Tabela 9 - Estudo do efeito de detergentes na atividade enzimática de <i>Alcaligenes sp.</i>	114
Tabela 10 - Características das lipases microbianas comerciais.....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Fotografia do microrganismo produtor de lipase alcalina.....	66
Figura 2- Efeito da melhor composição do meio de cultivo para a produção da lipase alcalina.....	68
Figura 3- Efeito do tempo de fermentação na produção da lipase alcalina.....	70
Figura 4- Efeito da temperatura na produção da lipase alcalina.....	70
Figura 5- Estudo do efeito de ácidos graxos na produção da lipase alcalina.....	72
Figura 6- Efeito da fonte de carbono na produção de lipase: Triglicerídeos.....	73
Figura 7- Efeito da fonte de carbono na produção de lipase: carboidratos.....	75
Figura 8- Estudo da fonte de nitrogênio para a produção de lipase alcalina.....	76
Figura 9 - Efeito do pH na atividade da lipase alcalina.....	77
Figura 10- Efeito do pH na estabilidade da lipase	78
Figura 11- Efeito da temperatura na atividade da lipase	79
Figura 12- Efeito da temperatura na estabilidade da lipase alcalina.....	80
Figura 13A- Curva de hidrólise do óleo de oliva em função do tempo.....	81
Figura 13B- Cromatografia dos produtos de hidrólise em óleo de oliva pela lipase bruta de <i>Alcaligenes sp.</i>	83
Figura 14A -Curva de hidrólise dos diferentes substratos em função do tempo.....	84
Figura 14B- Cromatografia dos produtos de hidrólise em diferentes substratos pela lipase bruta de <i>Alcaligenes sp.</i>	86
Figura 15 - Curva de hidrólise do óleo de oliva na presença de Ca^{++} e Mg^{++}	89
Figura 16- Estudo da ação hidrolítica da lipase em diferentes substratos.....	91

Figura 17- Esterificação de ácido oléico com glicerol pela lipase alcalina.....	93
Figura 18- Cromatograma da purificação em coluna DEAE Sephadex A 50 da lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	95
Figura 19- Fluxograma da produção e purificação da lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	96
Figura 20- Efeito do pH na atividade das frações I e II.....	98
Figura 21- Efeito do pH na estabilidade das frações I e II.....	100
Figura 22- Efeito da temperatura na atividade das frações I e II.....	101
Figura 23- Efeito da temperatura na estabilidade das frações I e II.....	102
Figura 24- Cromatografia dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela fração I da lipase purificada de <i>Alcaligenes sp</i>	107
Figura 25- Cromatografia dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela fração II da lipase purificada de <i>Alcaligenes sp</i>	108
Figura 26- Eletroforese das frações I e II da lipase purificada de <i>Alcaligenes sp</i> em gel de SDS - PAGE.....	111
Figura 27- Efeito de detergentes na atividade enzimática da lipase comercial e lipase de <i>Alcaligenes sp</i>	116
Figura 28 - Efeito de protease na atividade enzimática da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	117
Figura 29- Efeito da temperatura na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	118
Figura 30- Efeito do pH na atividade da lipase de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial.....	119
Figura 31- Ação das lipases de <i>Alcaligenes sp</i> e lipase comercial na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão.....	122

RESUMO

Quinhentas e cinquenta linhagens de microrganismos foram isolados do solo, frutas, resíduos industriais e testados quanto à capacidade de hidrolisar glicerídeos em meio alcalino.

Cinco linhagens de bactérias foram selecionadas como produtoras de lipase alcalina. Entre elas, uma linhagem identificada como *Alcaligenes sp.*, apresentou alta produção de lipase alcalina em meio de cultivo composto por: 2% de farinha de soja torrada, 1% farinha de trigo, 0,5% de K_2HPO_4 , 1% de água de maceração de milho (corn steep liquor) e 0,2% de Na_2CO_3 .

A enzima lipolítica de *Alcaligenes sp.* hidrolisou as ligações éster de triglicerídeos insolúveis em água, podendo assim, ser classificada como lipase (Glicerol Éster Hidrolase E.C.3.1.1.3).

Estudou-se a produção da lipase extracelular pela linhagem selecionada, a caracterização da enzima no estado bruto e a purificação através de fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna DEAE- Sephadex A-50. Na purificação das proteínas, foram detectadas 2 frações com atividade de lipase, sendo denominadas de frações I e II. As frações foram coletadas e concentradas em membrana de ultrafiltração. A fração I apresentou atividade ótima em pH 8 a 40°C. A fração II apresentou atividade ótima em pH 9 a 45°C.

A presença de $MgSO_4$ e $CaCl_2$ provocaram um aumento da atividade enzimática das duas frações, por outro lado, $ZnSO_4$ e $FeSO_4$ inibiram moderadamente a atividade enzimática de ambas frações.

Os reagentes cisteína e β -mercaptoetanol inibiram significativamente a atividade enzimática das frações I e II.

A esterificação de ácido graxo e glicerol pela lipase bruta de *Alcaligenes sp.* foi examinada e verificou-se que a enzima esterificou apenas 34% após 48 horas de incubação.

A lipase bruta de *Alcaligenes sp.* mostrou-se estável na presença de detergentes e protease a pH 9.

SUMMARY

The screening of alkaline lipase of producing microorganisms was performed using 550 strains of microorganisms which were isolated from samples of soil, fruits and industrial residues.

It was found that five strains of bacteria produced high activity of extracellular lipase and one of them produced exceptionally high alkaline lipase activity. This strain was identified as *Alcaligenes sp.* The medium for lipase production was composed of 2% roasted soybean meal, 1% wheat meal, 0,5% K_2HPO_4 , 1% of corn steep liquor and 0,2% Na_2CO_3 . Maximum enzyme activity with olive oil as substrate was observed at pH 9,0 at 45°C. The enzyme extract was purified by fractionation with ammonium sulfate and DEAE Sephadex A-50 column chromatography. In the elution between 0,1M and 0,3M of NaCl, two active fractions were separately, collected, concentrated by ultrafiltration on membrane and characterized.

It was observed that optimum pH activity for the fraction I was 8,0 at 40°C with olive oil as substrate. The optimum pH activity for the fraction II was 9,0 at 45°C with olive oil as substrate. The effects of various metal ions and other reagents at the final concentration of 1 mM on the lipase activity were studied. The fractions I and II were inhibited by $ZnSO_4$ and $FeSO_4$, on other hand $CaCl_2$ and $MgSO_4$ increased the activity. Both fractions were inhibited by β -mercaptoethanol and cysteine.

The enzymatic esterification using oleic acid and glycerol by lipase from *Alcaligenes sp.* was examined. It was found that the reaction system esterified only 34% after 48 hours of reaction time.

The lipase from *Alcaligenes sp.* was stable on detergents and protease systems.

1-INTRODUÇÃO

Lipases (Glicerol ester hidrolases E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas de larga ocorrência em plantas, animais e microrganismos. Sua função biológica é catalisar a hidrólise de óleos e gorduras, fornecendo ácidos graxos livres, diglicerídeos, monoglicerídeos e glicerol. Esta reação é reversível pois lipases também catalisam a formação de glicerídeos a partir de ácidos graxos e glicerol na interface óleo- água.

As lipases têm sido estudadas por muitos anos e podem ser produzidas em grande escala industriais através de fermentadores por vários microrganismos. Atualmente há um crescente interesse no desenvolvimento de novas aplicações para estas enzimas em produtos e processos, particularmente em indústrias de laticínios, hidrólise de óleos e gorduras e detergentes. Lipases podem hidrolisar lipídios e produzir sabor rançoso em leite, produtos lácteos e outros alimentos contendo gordura. Por outro lado, são essenciais para o desenvolvimento de “flavors” e aromas característicos em muitos alimentos.

De acordo com a especificidade da lipase, esta pode ser utilizada na interesterificação de óleos e gorduras, alterando a composição e as características do produto formado.

O presente trabalho visou o isolamento, seleção, classificação do microrganismo produtor de lipase alcalina e o estudo das características bioquímicas da lipase produzida bem como as possíveis aplicações industriais da lipase na área de óleos e gorduras e em sistemas detergentes. O microrganismo selecionado como melhor produtor de lipase foi utilizado para a produção da enzima. A preparação bruta da lipase extracelular de *Alcaligenes sp.* foi submetida à purificação, sendo a enzima purificada caracterizada quanto às suas propriedades bioquímicas.

2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CUTCHINS *et alii*, em 1952 (8), estudando as condições de cultivo que influenciam a produção de lipases bacterianas, selecionaram 3 linhagens microbianas pertencentes aos gêneros: *Alcaligenes viscosus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* linhagem ISC2F4, de acordo com a sua habilidade em hidrolisar óleos e gorduras naturais. Os substratos utilizados como fonte de carbono no meio de cultivo foram: óleo de algodão, óleo de oliva, óleo de amendoim, óleo de soja e gordura de côco. Os autores verificaram que, a adição de vitaminas no meio de cultivo contendo sulfato de amônio e óleo de oliva, resultaram em um aumento da produção de lipase e massa celular pelos microrganismos estudados. Fonte de nitrogênio de origem orgânica como peptona e extrato de malte, tiveram um efeito ativador na produção de lipase. Glicina foi a fonte de nitrogênio mais efetiva na produção de lipase para *A. viscosus* e *P. aeruginosa* linhagem ISC2F4 enquanto ácido L- aspártico foi a melhor fonte de nitrogênio para *Pseudomonas fluorescens*. Glicose ou ácidos graxos utilizados no meio de cultivo não foram efetivos para a produção de lipase para todas as linhagens.

NASHIF & NELSON, em 1953 (45), realizaram estudos relativos aos fatores físicos e nutricionais que afetam a produção da lipase de *Pseudomonas fragi*. Os autores verificaram que a máxima produção da lipase extracelular de *P. fragi* ocorreu após 72 horas de incubação à temperatura de 15°C. Pouca ou nenhuma atividade foi produzida a 30°C. No entanto, em períodos de incubação maiores que 72 horas a baixas temperaturas, houve um aumento considerável na produção de lipase. O pH ótimo verificado para a produção de lipase de *P. fragi* esteve na faixa de 6,5 a 7,5. Em relação aos fatores nutricionais do meio de cultivo, os autores observaram que quando glicose ou lactato foram utilizados como fonte de carbono e sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio, houve um aumento da produção de lipase. Porém, em meio de cultivo contendo glicose ou citrato como

fonte de carbono, suplementados com L - leucina ou uma associação de L- leucina, DL- isoleucina e DL- valina, induziram ao aumento da produção de lipase. A adição de pequenas quantidade de tricaprilina, ácido caprílico ou ácido cáprico causaram um aumento pronunciado na produção de lipase.

HARPER & LONG, em 1956 (18), analisaram a influência de ácidos graxos e aminoácidos livres em queijo provolone comercial, e verificaram que o tipo de ácido graxo dependia do tipo da lipase utilizada na sua produção. A intensidade do sabor desejável estava relacionada com a concentração de ácido butírico produzido e ácido glutâmico liberado, indicando que na composição do sabor deve-se considerar os produtos de degradação tanto da gordura, como da proteína simultaneamente.

ALFORD & ELLIOTT, em 1960 (1), realizaram estudos com o objetivo de detectar os efeitos e as condições nutricionais, pH, aeração e temperatura que afetam a produção e atividade lipolítica por *Pseudomonas fluorescens*, quando gordura foi utilizada como substrato. Foi encontrado que 1% de peptona no meio de cultivo e um pH no valor de 7, aumentaram a produção de lipase. O pH ótimo para a produção da enzima 7, embora também tenha sido detectada em pH ao redor de 6. À temperatura de 20°C, a liberação da enzima foi facilmente observada após 2 ou 3 dias de incubação. A temperatura ótima para a produção lipolítica foi de 40°C.

ALFORD & PIERCE, em 1963 (2), analisaram as condições de cultivo e produção de lipase por *Pseudomonas fragi*. O crescimento e produção de lipase por *P. fragi* foi determinado em 41 meios de cultivo de diferentes composições. Os autores verificaram um bom crescimento celular, mas pouca ou nenhuma atividade lipolítica em meio de cultivo contendo sulfato de amônio e glicose como fonte de nitrogênio e carbono respectivamente. A adição de arginina, lisina , ácido aspártico e ácido glutâmico produziram lipase em proporção similar quando comparada com meio de cultivo contendo peptona. A ausência de glicose no meio de cultivo não afetou o crescimento do microrganismo, porém, nenhuma atividade de lipase foi

detectada. A esterilização do meio de cultivo contendo aminoácidos, tampão fosfato ou a adição de vitaminas não afetou o crescimento do microrganismo, porém, nenhuma atividade lipolítica foi detectada.

IWAI *et alii*, em 1964 (23), estudaram o efeito de íon cálcio na atividade da lipase de *Aspergillus niger* no substrato óleo de oliva. Os autores verificaram que a ativação da enzima não ocorria no início da hidrólise, sendo necessário o acúmulo de certa quantidade de ácido oléico no curso da reação hidrolítica. Em contrapartida, quando se utilizou triglicerídeos constituídos de ácidos graxos de cadeia curta, o íon cálcio teve um efeito inibidor da ação enzimática.

MENCHER *et alii*, em 1967 (39), purificaram e caracterizaram a lipase de *Pseudomonas fragi* NRRL B-25. A lipase foi purificada 75 vezes com uma recuperação final de aproximadamente 20%. O pH ótimo para a enzima purificada utilizando-se tributirina como substrato foi de 8,6 a 25°C. A enzima estudada, foi termolábil, pois a sua exposição a temperatura de 45°C por 10 minutos, causou completa inativação da lipase. A lipase de *P. fragi* NRRL B 25, apresentou-se estável em pH na faixa de 6,6 a 7,8.

LAWRENCE, em 1967 (32), reportou as classes das enzimas lipolíticas e alguns dos fatores que influenciam a produção e importância das lipases e classificação de lipases e esterases, relatando que o termo lipases se refere às enzimas que hidrolisam somente as ligações ésteres, solúveis em sistema aquoso, e que a separação entre lipase e esterase não está ainda definida. Lipase foi definida de acordo com a União Internacional de Bioquímica, como glicerol éster hidrolase (E.C. 3.1.1.3) em 1961. O autor relata que alguns microbiologistas acreditam que as lipases somente hidrolisam ésteres emulsificados de glicerol, enquanto as esterases hidrolisam substratos solúveis em sistemas aquosos. Foi enfatizado que apesar da forma na qual pode ser feita, a classificação entre esterases e lipases, nenhuma única propriedade permite a distinção geral entre esterases e lipases microbianas. A definição mais satisfatória encontrada até o presente, parece ser que

lipases atacam triglicerídeos insolúveis simplesmente porque eles são os substratos naturais mais comuns, atacados por lipases microbianas.

Oi *et alii*, em 1967 (50), realizaram a purificação da lipase de *Penicillium crustosum*. Neste estudo os autores verificaram a presença de 3 tipos de lipase (I~III) no fracionamento por cromatografia em coluna de DEAE- celulose. As lipases I e II foram purificadas e obtidas na sua forma cristalizada e analisadas quanto às suas características bioquímicas. Foi verificado que a lipase I apresentou peso molecular de 29.000, pH de estabilidade na faixa de 6 a 9 e uma termoestabilidade até 45°C, sendo completamente inativada acima de 80°C por 15 minutos. O substrato mais rapidamente hidrolisado foi o óleo de oliva. Por outro lado, a lipase II, apresentou peso molecular de 32.000, pH de estabilidade na faixa situada entre 7 e 9 e termoestabilidade até 45°C, semelhante àquela encontrada para a lipase I. O substrato mais facilmente hidrolisado pela lipase II foi tributirina. As lipases I e II de *Penicillium crustosum* foram inibidas por íons Cu^{++} , no entanto, foi observado aumento da atividade lipolítica em óleo de oliva, na presença de íons metálicos bivalentes como Ca^{++} e Mn^{++} , no sistema de reação.

KHAN *et alii*, em 1967 (25), estudando a produção e propriedades de uma lipase produzida por *Achromobacter lipolyticum*, verificaram que a quantidade máxima de lipase produzida extracelularmente ocorria quando o microrganismo era incubado a 21°C por 36 horas em meio casitone em pH 7,0. A adição de 1% de óleo de oliva, óleo de milho ou gordura de leite e agitação branda triplicou a produção de lipase. A enzima produzida possuía pH ótimo de 7 e temperatura ótima de 37°C e alta resistência térmica, pois o aquecimento a 71°C por 180 minutos destruía atividade em somente 47%. A atividade enzimática foi estimulada por vários sais, obtendo-se com MgCl_2 o maior efeito. A gordura de leite foi hidrolisada mais rapidamente que os óleos de milho e oliva. A atividade lipolítica foi medida utilizando-se vários tampões a pH 7. Na presença de tampão fosfato de potássio, observou-se maior atividade lipolítica. A lipase de *Achromobacter* apresentou taxas

de reação para oleilglicerídeos mais altas que para butilglicerídeos, revelando que a enzima é possivelmente mais ativa para glicerídeos que contenham ácidos graxos insaturados de cadeia longa.

SAGERS & STEWART, em 1968 (61), relataram estudos referentes à lipases e esterases produzidas por microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Para realizar este estudo, os autores selecionaram 731 linhagens isoladas de secreções hospitalares e testadas quanto à sua capacidade hidrolítica frente aos substratos tripalmitina, trioleína e tributirina. As linhagens foram inoculadas em meio de cultura contendo 1% de substratos emulsificados em 2% de ágar nutriente e incubadas a 37°C por 48 horas. A atividade lipolítica das linhagens foi detectada pela formação de zonas claras ao redor das colônias em meio tributirina/ágar e pela adição de solução saturada de sulfato de cobre em trioleína e tripalmitina/ágar com o objetivo de detectar a liberação de ácidos graxos pela formação de um precipitado de sais de cobre. Os microrganismos também foram testados quanto à produção de α e β hemolisina, coagulase e β -lactamase. Os autores verificaram neste estudo, que 85% das linhagens de *Staphylococcus*, hidrolisaram tripalmitina, com uma correlação entre hidrólise de substratos e produção de coagulase em linhagens apigmentadas. A lipase de uma linhagem, identificada como *Staphylococcus aureus* foi estudada. O complexo enzimático extraído da célula dessa linhagem, hidrolisou todos os ésteres solúveis em água e ésteres de glicerol de cadeia curta em solução aquosa. Os ésteres compostos por ácidos graxos de cadeia média e longa, tricaproína, tricaprilina e trioleína, foram hidrolisados somente após serem emulsificados. Em relação à especificidade de substrato, no entanto, dois componentes estiveram presentes: um componente com ação de esterase e outro com ação lipolítica.

LU & LiSKA, em 1969 (37), estudaram as propriedades da lipase de *Pseudomonas fragi* purificada. Foi utilizado óleo de côco como substrato, e o pH ótimo encontrado foi na faixa entre 7,5 e 8,9. A taxa de reação foi maior na faixa

de temperatura entre 17 e 54°C. A lipase de *P. fragi* foi termoresistente, perdendo apenas 27,1% de atividade após 1 hora de tratamento a 62°C. A inativação foi completa a 66°C após 1 hora de tratamento ou a 71°C por 10 minutos. A lipase foi fortemente inibida na presença de íons Fe^{+2} e Fe^{+3} e brandamente inibida por íons Co^{+2} e Cu^{+2} , Zn^{+2} , não ocorrendo inibição na presença de Ca^{+2} ou NaF. A atividade lipolítica da enzima estudada foi inibida por paracloromercuriobenzoato, mas os efeitos de N -etilmaleimida e iodoacetato foram moderados. A enzima hidrolizou ácidos graxos naturais, triglicerídeos sintéticos e ésteres. A lipase apresentou especificidade pelos seguintes substratos: trilaurina, tricaprilina, tricaproína e triestearina.

SOMKUTH *et alii*, em 1969 (65), estudaram algumas características da lipase produzida por *Mucor pulsillus* e compararam as propriedades desta enzima com a enzima produzida por outras lipases fúngicas. A enzima foi produzida em suspensão de farelo de trigo a 2% e incubação por 5 dias a 35°C sendo observado que além da atividade de hidrolisar monoglicerídeos, esta lipase apresenta atividade de esterase sobre ésteres metílicos de ácidos graxos. A atividade de esterase foi dependente do comprimento da cadeia do ácido graxo e a ação foi maior contra metildodecanoato. Segundo os autores, o pH ótimo de atividade para a óleo de oliva e metildodecanoato está entre 5 e 5,5, o que é similar aos valores reportados para as lipases fúngicas. Agentes quelantes como EDTA e inibidores enzimáticos como cisteína, 2-mercaptoetanol, paracloromercuriobenzoato não exerceram efeito na ação de hidrólise, bem como na ação esterificação. Estes resultados indicam que a lipase não é uma metaloenzima e não requer grupos SH livres ou pontes dissulfeto (S - S) intactas para a atividade.

TROLLER & BOZEMAN, em 1970 (72), isolaram e caracterizaram microrganismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* coagulase negativa isolados da epiderme humana e analisados quanto à sua capacidade de produzir lipase. A atividade lipolítica das linhagens foi detectada no meio de cultura durante

a fase estacionária. A máxima atividade lipolítica foi obtida quando o pH do meio de cultura foi ajustado para 7,5 antes da inoculação. Após a inoculação a cultura foi incubada a 37°C por 40 horas. A lipase foi purificada através de cromatografia em coluna de DEAE- Sephadex G- 100 e caracterizada. A enzima purificada apresentou pH ótimo de 7,5 e temperatura ótima de aproximadamente 32°C. A lipase na forma bruta e purificada mostrou-se específica para substratos com cadeia carbônica variando de C₄ a C₁₀, embora trioleína pura também tenha sido hidrolisada. Nenhuma atividade lipolítica foi encontrada quando se utilizou ésteres metílicos de ácido butírico, octanóico e mirístico. Estudos referentes à estabilidade da enzima bruta e purificada, revelaram uma taxa de 100% de inativação quando as enzimas foram aquecidas à temperatura de 70°C em pH 8 por 4 minutos em tributirina. A atividade da lipase purificada na presença de íons metálicos foi determinada. Foi verificado neste experimento que, em concentrações menores de Ca⁺⁺, (1 x 10⁻⁶ M) e tributirina como substrato, houve um ligeiro aumento da atividade lipolítica. Por outro lado, a hidrólise de trioleína foi dependente da presença de íons Ca⁺⁺ no sistema de reação. A máxima atividade lipolítica em trioleína foi obtida, quando a concentração de íons Ca⁺⁺ foi de 7,5 x 10⁻³ M. A adição de NaCl no sistema de reação produziu um acentuado declínio na atividade lipolítica na hidrólise de tributirina. Inibidores enzimáticos como paracloromercuriobenzoato (PCMB) não tiveram efeito inibidor da atividade lipolítica da enzima isolada de *Staphylococcus*.

EITENMILLER *et alii*, em 1970 (11), estudaram as condições de cultivo, produção e propriedades da lipase de *Penicillium roquefort*. A linhagem de *P. roquefort* teve produção máxima de lipase, quando inoculada em meio de cultivo contendo 0,5 de casitone e 1% de meio proflo em pH de 5,5 a 27°C. A adição de gordura, óleo de milho ou óleo de oliva inibiram a produção de lipase. A lipase parcialmente purificada de *P. roquefort* apresentou um pH ótimo de 8 e temperatura ótima de 37°C. Máxima atividade lipolítica ocorreu quando se utilizou gordura

emulsificada como substrato. Os íons de cálcio e magnésio aumentaram a atividade enzimática. Sais de sódio e potássio não afetaram a atividade lipolítica, no entanto, sais de zinco e mercúrio, tiveram um efeito inibidor da atividade lipolítica de *P. roquefort*. A lipase apresentou-se termolábil, sendo completamente inativada quando aquecida por 10 minutos a 50°C. Os substratos hidrolisados pela lipase foram em ordem decrescente: tributirina, tricaprilina e trioleína.

FINKELSTEIN *et alii*, em 1970 (13), caracterizaram e purificaram parcialmente a lipase extracelular de *Pseudomonas aeruginosa*, isolada do meio de cultivo. A lipase apresentou pH ótimo de 8,9 e temperatura ótima de 40°C. Triglicerídeos, mono e diglicerídeos emulsificados foram os substratos hidrolisados pela enzima. A lipase foi inibida por protamina, taurocolato de sódio, heparina, substâncias inibidoras de grupos sulfidrílicos. A enzima foi purificada 35 vezes por cromatografia em coluna de DEAE Sephadex G- 200. A eletroforese da lipase purificada de *Pseudomonas aeruginosa*, revelou a presença de 2 frações proteicas, nas quais somente uma apresentou atividade lipolítica. A lipase purificada foi capaz de hidrolisar rapidamente frações lipoproteicas do soro humano.

TSUJISAKA *et alii*, em 1972 (73), realizaram um estudo comparativo de algumas propriedades de lipases fúngicas. *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*, foram selecionados como produtores de lipase. *A. niger* produziu lipase especialmente em meio sólido, enquanto os outros 3 fungos produziram grande quantidade de lipase em meio líquido. Todas as enzimas foram ativadas na presença de íons de cálcio e severamente inativadas na presença de íons férricos e ferrosos. Com relação a capacidade de síntese de glicerídeos, as lipases de *Rhizopus delemar* e *A. niger* apresentaram larga especificidade para vários ácidos graxos, enquanto a lipase de *G. candidum* e *P. cyclopium* foram mais restritas.

TSUJISAKA *et alii*, em 1973 (74), relataram estudos referentes à indução da formação de lipase de *Geotrichum candidum* Link. Esta linhagem foi selecionada

como produtora de lipase cuja principal característica observada foi, a formação de lipase somente na presença de triglicerídeos e ácidos graxos no meio de cultivo. Dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a presença de óleos no meio de cultura, não afetou somente o crescimento do microrganismo, mas também a produção da lipase de *G. candidum*. Substratos com óleo de oliva na concentração de 3% produziram uma atividade máxima de 7,64 U/mL em 6 horas de incubação a 30°C. Os ácidos graxos de cadeia longa como ácido oléico, linoléico ou Span 80 (sorbitol monoestearato), na concentração de 1%, também tiveram um efeito indutor para a produção de lipase de *G. candidum* Link. No entanto, os ácidos graxos de cadeia curta, como ácido butírico, não foram efetivos na formação da lipase pelo microrganismo.

No mesmo ano, TSUJISAKA *et alii* (75), purificaram a lipase de *Geotrichum candidum* (Link) e estudaram algumas de suas propriedades. A composição química da lipase cristalizada indicou a presença de 7,5% de manose como componente principal entre os açúcares presentes que foram xilose, arabinose e galactose. Foi detectada também a presença de lipídio formado de vários tipos de ácidos graxos não sendo esclarecido se a fração lipídica é necessária para a atividade enzimática ou não. A enzima foi mais ativa em valores de pH entre 5,6 e 7 e foi estável na faixa de 4,6 a 5,8 durante incubação por 24 horas a 30°C. A temperatura ótima foi estimada ser 40°C e a enzima foi estável a temperatura abaixo de 55°C a pH 5,6 por 15 minutos.

YAMAGUCHI *et alii*, em 1973 (79), isolaram uma linhagem de bactéria pertencente ao gênero *Chromobacterium viscosum* utilizando emulsão de gordura de boi como substrato no meio de cultura. A lipase obtida demonstrou pH ótimo de atividade entre 7 e 8 que é o mesmo valor para a lipase pancreática, sendo ainda bastante ativa a pH ácido. A temperatura ótima para a atividade lipolítica foi 65°C quando determinada a atividade em pH 7, porém a enzima demonstrou ser ativa após exposição a várias temperaturas, perdendo cerca de 97% de atividade quando

aquecida por 10 minutos a 100°C. A enzima demonstrou ser estável a uma faixa de pH de 3 a 9 após 24 horas de incubação a 37°C. Com relação ao tipo de substrato hidrolisado, a lipase de *Chromobacterium* foi capaz de hidrolisar vários óleos e gorduras, demonstrando porém ser mais ativa em gordura vegetal que animal. A atividade enzimática foi estimulada por íons de Ca^{+2} e Mg^{+2} e inibida por íons de Cu^{+2} e Sn^{+2} .

SUGIURA *et alii*, em 1974 (68), continuando o estudo anterior, estudaram e verificaram as características da lipase purificada de *Chromobacterium viscosum*. A enzima foi purificada em resina de troca iônica DEAE- Sephadex G-100 e DEAE Sephadex G -50. A lipase apresentou peso molecular de 27.000 e ponto isoelétrico de 6,9. O pH e a temperatura ótima encontrados para a hidrólise em óleo de oliva foram de 6,5 e 70°C respectivamente, e uma termoestabilidade ao redor de 40°C. A enzima mostrou-se completamente inativa a 60°C por 20 minutos. A lipase purificada de *Chromobacterium viscosum* foi fortemente inibida por íons Zn^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , no entanto, metais pesados como Hg^{++} , Ag^{+} , Pb^{++} não inativaram a enzima. Sais de bile não afetaram a atividade enzimática

SEITZ em 1974 (62), descreveu as diversas aplicações industriais para lipases microbianas entre elas, a aplicação de lipases em processamento de alimentos, principalmente em laticínios na produção de “flavors” em queijos. Microrganismos com atividade lipolítica presentes em leite não pasteurizado (*Pseudomonas fragi*, *P. fluorences* e *Achromobacter lipolyticus*) são essenciais na produção de “flavors” em queijos devido a produção de ácidos graxos. Lipases microbianas podem também ser utilizadas em cosméticos atuando na remoção de lipídios na epiderme. O autor cita a utilização de lipase microbiana (*Candida cylindracea*) em compostos detergentes descrita em patente alemã (Henkel and Cie, G.m.b.H.). As lipases de *Candida cylindracea*, *Candida lipolytica* e *Pseudomonas stutzeri* são preferidas para a utilização em detergentes em relação às

lipases de origem animal e vegetal devido a fácil incorporação em sistemas detergentes.

JONSSON & SNYGG, em 1974 (24), estudaram as condições de cultivo de quatro linhagens microbianas. A atividade lipolítica presente no líquido sobrenadante das culturas de *Saccharomyccopsis lipolytica*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus licheniformes* e *Staphylococcus sp*, foram estudadas. Ágar nutriente com ou sem óleo de oliva emulsificados foram utilizados como substrato, na detecção da atividade lipolítica. O pH e temperatura ótima de atividade para as quatro linhagens foram determinados. A atividade lipolítica atingiu um valor máximo após 2 a 6 dias de incubação. Observou-se que, a subsequente diminuição da atividade lipolítica de *Micrococcus caseolyticus* foi associada com uma alta atividade proteolítica. A atividade lipolítica diminuiu na presença de óleo de oliva no meio de cultivo. O pH e temperatura ótimos para a produção de lipase por *M. caseolyticus* foram de 9,5 e 40°C respectivamente. A lipase de *B. licheniformes* produziu máxima atividade lipolítica a 45°C em pH 8,5. As lipases de *Staphylococcus* e *S. lipolytica* produziram máxima atividade lipolítica às temperaturas de 35°C e 30°C e pH 8,5 e 9,5 respectivamente. Os autores verificaram que óleo de oliva no meio de cultivo, apresentou um efeito inibidor na atividade lipolítica de todas as linhagens testadas.

OKUMURA *et alii*, em 1976 (52), estudando a especificidade de quatro diferentes lipase microbianas, verificaram que as lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* hidrolisaram trioleína e produziram 1,2 (2,3) dioleína e 2-monoleína. Por outro lado, as lipase de *Geotrichum candidum* Link e *Penicillium cyclopium*, atacaram a cadeia de ácidos graxos independente da posição. A lipase de *Geotrichum candidum* liberou ácido palmítico e ácido oléico em preferência ao ácido esteárico da gordura de côco.

TORNQVIST & BELFRAGE, em 1976 (71), estudaram algumas propriedades de uma monoacilglicerol hidrolase isolada de tecido adiposo de ratos.

A enzima foi purificada 2.500 vezes. A condição primordial para este estudo, segundo os autores, foi a solubilização da enzima, presumivelmente formando um complexo detergente pela sonicação com uma solução alcoólica de poliestireno, composto não iônico. A purificação foi realizada em coluna de troca iônica e cromatografia em gel, seguida de focalização isoelétrica na presença de detergente. A eletroforese em SDS-PAGE indicou um grau de pureza de 85%, e peso molecular aparente de 32.900. A enzima purificada apresentou um pI de 7,2 e pH ótimo de 8. A estabilidade da enzima foi altamente dependente da presença de pequenas quantidades de detergentes e grupos SH- livres. A enzima apresentou uma alta atividade hidrolítica em monoacilglicerol, contudo, uma pequena atividade lipolítica foi observada sobre os substratos p-nitrofenilacetato 1(3) e 2 monoleilglicerol. No entanto, nessas mesmas condições, a enzima não catalizou a hidrólise de trioleilglicerol emulsificado, dioleilglicerol ou colesterol oleato emulsificado. Esses resultados segundo os autores, torna possível a hipótese da referida enzima ser uma monoacilglicerol hidrolase específica.

SUGIURA *et alii*, em 1977 (69), purificaram e estudaram as propriedades da triacilglicerol lipase de *Pseudomonas fluoresces*. A lipase de *Pseudomonas fluoresces* foi purificada em cromatografia de coluna em DEAE-Sephadex G- 75 e DEAE celulose. O peso molecular da enzima purificada foi de 32.000. O pH ótimo para a hidrólise em óleo de gergelim foi de 7. A enzima foi estável em temperaturas acima de 40°C em pH 7,0 por 30 minutos e reteve mais de 80% de atividade em pH situado na faixa de 5,0- 11 a 37°C por 60 minutos. A lipase foi parcialmente inibida por FeCl₂ e N- Bromosuccinamida. Em relação à especificidade de substrato, a lipase de *Pseudomonas fluoresces* mostrou-se ativa em triglicerídeos sintéticos, constituídos de um único tipo de ácido graxo de cadeia variando de C₁₀ a C₁₈, como tripalmitoilglicerol e tricaproilglicerol em pH 7 a 55°C.

WATANABE *et alii*, em 1977 (78), isolaram e identificaram lipase alcalina microbiana, estudaram as condições para o cultivo dos microrganismos visando a produção da enzima e algumas propriedades da enzima bruta. Duas linhagens isoladas foram identificadas como *Pseudomonas nitroreducens* e *Pseudomonas fragi*. As condições ótimas de cultura dos microrganismos foram pH inicial de 8,2 a 8,7 para *Pseudomonas nitroreducens* e 6,6 a 7 para *Pseudomonas fragi*, à temperatura entre 23 a 26,5°C e agitação de 300 rpm. A enzima produzida foi precipitada a pH 4,0 com HCl. As características bioquímicas foram determinadas no extrato bruto enzimático. O pH ótimo para ambas lipases foi de 9,5, embora a lipase de *Pseudomonas nitroreducens* tenha demonstrado ser ainda ativa em pH 10. As enzimas foram estáveis entre pH 5 e 11. A temperatura ótima para a lipase de *Pseudomonas fragi* foi de 80°C. Surfactantes iônicos inibiram as enzimas fortemente. A linhagem de *Pseudomonas fragi* produziu lipase extracelular e lipase ligada à célula, porém a taxa de produção de lipase extracelular para a lipase ligada à célula foi diferente de acordo com as condições de cultivo.

PAL *et alii*, em 1978 (57), descreveram as condições ótimas de cultura e a influência de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, microelementos e vitaminas na produção de lipase em culturas submersas de *Aspergillus niger*. Foi encontrado que a temperatura ótima foi de 35°C e o pH ótimo para fermentação foi de 7 num período de 96 horas. Dos açúcares testados, sacarose na concentração de 1% foi considerada a melhor fonte de carbono para a produção da lipase. Quando foi utilizado nitrato de amônio como fonte de nitrogênio na concentração de 0,1%, este produziu o melhor crescimento e produção da lipase. Os sais $MgSO_4$ e $FeSO_4$ desempenharam importante papel na produção da lipase. Gordura de manteiga e óleo de oliva na concentração de 1% causaram o melhor crescimento celular e produção da enzima.

CHANDER *et alii*, em 1979 (5), purificaram a enzima produzida por *Streptococcus faecalis* e estudando suas propriedades. A enzima purificada

apresentou ponto isoelétrico de 3,6 e peso molecular de 20,900 daltons. A lipase de *Streptococcus faecalis* apresentou termoestabilidade até 40°C por 10 minutos e foi completamente inativa a 90°C sendo o pH de estabilidade encontrado na faixa de 6 a 8. Neste estudo os autores verificaram que a adição de 0,2% de sais de bile no sistema de reação estimulou a atividade da lipase. O substrato que apresentou maior porcentagem de hidrólise foi tributirina, quando comparada a hidrólise de tricaprilina, tricaproína e trioleína. A lipase purificada hidrolisou eficientemente os óleos de côco e oliva.

OISAKA *et alii*, em 1980 (51), isolaram e purificaram uma lipase lipoteica (LPL), relatando a atividade lipolítica de uma linhagem fúngica identificada como *Rhizopus japonicus* KY 521. As duas enzimas foram isoladas em 2 picos de atividade por filtração em gel em resina de DEAE- Sephadex G- 100. O pico I , apresentou atividade de LPL e não atividade de lipase . As duas enzimas tiveram atividades catalíticas semelhantes. Ambas enzimas hidrolisaram tricaprilina em maior proporção que os outros substratos testados. O pH ótimo de atividade foi 8,3 e o pH de estabilidade esteve na faixa de 5~7 a 50°C. A atividade de LPL foi fortemente inibida por NaCl e protamina, enquanto a atividade de lipase não foi afetada por esses reagentes.

OKUMURA *et alii*, em 1981 (53) estudaram o efeito da ação reversa da lipase na hidrólise de triglicerídeos. Foram utilizadas as lipases purificadas de *Aspergillus niger* NRLL - 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 o transcorrer da hidrólise e no entanto a lipase não hidrolisa ligações éster na posição 2 do triglicerídeo. Segundo os autores esta é a causa pela qual o grau de hidrólise desta lipase é a menor dentre as quatro lipases. A lipase de *A. niger* embora também não hidrolise a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo, ocasiona a hidrólise gradualmente acima de 70%. A lipase de *Geotrichum candidum* hidrolisa ligações

éster em todas as posições do triglicerídeo. Esta lipase apresentou a mais fraca ação de esterificação durante a hidrólise de trioleína dentre as quatro lipases estudadas. A lipase de *P. cyclopium* tem ação de esterificação durante hidrólise, similar à de *R. deleamar*.

KOKUSHO *et alii*, em 1982 (29), isolaram e identificaram microrganismos produtores de lipase alcalina. As linhagens isoladas foram selecionadas baseadas no pH ótimo para a atividade na região alcalina, sendo que a atividade da lipase foi estimulada por sais biliares e grande quantidade de monoglicerídeos se acumulava durante a hidrólise de gordura. Os autores consideram que pelas características apresentadas, estes microrganismos pertencem ao gênero *Alcaligenes*.

KIMURA *et alii*, em 1982 (28), estudaram os efeitos de íons Ca^{++} , sais de bile e colipase (um cofator proteico) na lipase pancreática humana, a qual foi purificada do suco duodenal. Foi encontrado que goma arábica 10%, utilizada como estabilizante da emulsão, continha uma alta concentração de cálcio, entre 14 e 20 mM. O óleo de oliva foi estabilizado com gelatina para diminuir o conteúdo de cálcio do sistema de reação. Os íons de Ca^{++} ativaram a lipase pancreática na presença de sais de bile e colipase. Foi verificado um aumento da V_{max} na presença de cálcio e uma diminuição do K_m para o substrato na presença de sais biliares e colipase. Alta concentração de sais biliares inibiu a atividade na presença de colipase. Os autores concluíram que a atividade da lipase pancreática é regulada por 3 fatores: Ca^{++} , sais de bile e colipase, os quais podem aumentar a eficiência da atividade enzimática.

TYSKI *et alii*, em 1983 (76), purificaram e estudaram as características da lipase isolada de uma linhagem de bactéria pertencente ao gênero *Staphylococcus* a qual foi fracionada com sulfato de amônio e cromatografia por interação hidrofóbica, seguida de filtração em gel DEAE- Sephadex CL 4B. Neste experimento foi encontrado que a lipase de *Staphylococcus* apresentava 2 cadeias proteicas: uma cadeia pesada de aproximadamente 300 KDA e uma cadeia leve de 45 KDA. A análise de aminoácidos indicou que a lipase contém 17 aminoácidos com prevalência

de aminoácidos hidrofóbicos. Aminoácidos contendo enxofre não foram encontrados na molécula enzimática. A lipase estudada mostrou ser estável na faixa de pH 5 e 9 e exibiu máxima atividade a pH 8 e termoestabilidade a 50°C por 30 minutos, sendo completamente inativada a 65°C. A temperatura ótima de atividade lipolítica foi de 55°C em pH 8.

FOX & STEPANIAK, em 1983 (14), isolaram de leite refrigerado uma lipase produzida por uma linhagem de bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas*. A enzima foi purificada em DEAE Sephadex G-50 e filtração em gel de Sepharose 6LB. Nesse experimento, os autores obtiveram 3 lipases, as quais foram separadas por filtração em gel, sendo que a principal lipase, representando aproximadamente 71% da atividade total, foi caracterizada. A enzima purificada apresentou atividade máxima em tributirina em pH 8 a 35°C; com K_m de 3,65 mM e foi inibida por concentrações de substrato superiores a 17mM. A lipase foi estável em pH na faixa de 60 a 80°C, sendo estabilizada significativamente por íons cálcio.

MACRAE em 1983 (38), relatou a obtenção de misturas de glicerídeos, impossíveis de serem obtidos por interesterificação química, através do uso de lipases considerando-se a sua especificidade. Se a lipase não específica é usada para catalisar a interesterificação de uma mistura de triglicerídeos, os triglicerídeos obtidos são similares àqueles obtidos pela interesterificação química. Porém se for utilizado lipase 1,3 específica, a migração acila será confinada às posições 1 e 3. Misturas de triglicerídeos e ácidos graxos livres serão trocados pelos grupos acila do triglicerídeos produzindo novos triglicerídeos enriquecidos com o ácido graxo acrescentado. A habilidade para produzir novas misturas de triglicerídeo usando lipases específicas é de interesse da indústria de óleo e gorduras, porque alguns compostos assim produzidos têm propriedades adequadas a um determinado fim. A interesterificação catalisada por lipases 1,3 específica do triglicerídeo 1,3 dipalmitoil -2 - monoleína (POP) que é a fração preponderante do óleo de palma com ácido esteárico, leva a 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 é possível utilizar a reação de interesterificação para produzir um análogo da manteiga de cacau a partir de matéria prima de baixo custo.

LINFIELD *et alii*, em 1984 (34), estudaram a hidrólise de óleo de côco por lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrizus* e a esterificação de ácido oleico com glicerol e outros álcoois na presença da lipase de *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*. A banha e o óleo de côco foram lipolisados à mesma taxa, enquanto que para o óleo de oliva a taxa foi maior. Com relação ao efeito dos íons na atividade enzimática, os autores verificaram que íon sódio não apresentou efeito, porém o íon cálcio mostrou ser inibidor. A lipólise com a lipase de *Aspergillus niger* foi similar a de *Candida rugosa*. Estas não são específicas, isto é atacam as posições 1 e 2 do triglicerídeo. A lipase de *C. rugosa* é sensível ao calor e a inativação da enzima ocorreu a 52°C. Ambas lipases foram capazes de hidrolisar os três substratos completamente em 72 horas.

KIM *et alii*, em 1984 (27), estudaram os efeitos de solventes orgânicos na hidrólise de triglicerídeos pela enzima de *C. rugosa*, com o objetivo de selecionar o melhor solvente em relação aos parâmetros de estabilidade e atividade catalítica da lipase estudada. Os solventes utilizados nesse estudo foram os hidrocarbonetos: n-hexano, n- heptano, n- octano, iso- octano e ciclohexano e éteres com dietiléter, diisopropil éter e di- n- butil- éter. Os substratos trioleína e tributirina altamente purificados foram utilizados. Os resultados obtidos nesse experimento demonstraram uma atividade remanescente de 90 a 95% quando n- octano e éteres estiveram presentes no sistema de reação a 35°C por 2 horas de incubação, mantendo-se constante após esse período.

POSORSKE em 1984 (59), descreveu os benefícios industriais da aplicação de lipases para a indústria de óleos e gorduras, descrevendo que há três vantagens oferecidas pelas enzimas em relação aos processos químicos tradicionais utilizados:

especificidade, condições brandas e menor desperdício. As aplicações das lipases são descritas como produção de lipolizados de gordura de leite para adicionar em “fast foods”. Novas aplicações de lipases com potencial industrial são hidrólise de óleos e gorduras para produção de ácidos graxos, síntese de lipídios pela reação de esterificação e a produção de lipídios estruturados e novos lipídios pela reação de interesterificação. Como nenhuma destas aplicações é ainda comercial, cada possibilidade é foco de intensa investigação.

LINFIELD *et alii*, em 1985 (35), desenvolveram um método simples para medir a atividade lipolítica. A emulsificação do sistema de reação foi realizada com agitação ultra-sônica sem a utilização de emulsificantes. Os autores relataram que para os dados de hidrólise enzimática serem reprodutíveis é necessária uma boa emulsificação inicial, pois após iniciada a hidrólise, os diglicerídeos e monoglicerídeos formados agem como emulsificantes do sistema. Os autores basearam-se no fato de que com uma boa emulsificação inicial, a área de contato substrato - superfície é bem maior.

HOFELMAN *et alii*, em 1985 (19) isolaram, purificaram e caracterizaram isoenzimas de uma lipase comercial obtida de *Aspergillus niger*. As enzimas foram isoladas utilizando cromatografia em coluna com diferentes tipos de resina, tendo sido encontrado duas lipases de diferentes atividades denominadas I e II. A lipase I apresentou peso molecular de 31.000 e lipase II 19.000. O conteúdo de carboidratos nas lipases purificadas I e II foram estimadas em 6 e 9% respectivamente. As enzimas não demonstraram diferença na atividade contra triglicerídeos com ácidos graxos de cadeia C_4 e C_{16} . A lipase II predominante catalisou a hidrólise de ésteres de ácidos graxos de cadeia curta. As lipases I e II demonstraram um máximo de atividade entre pH 5 e 6 e mantiveram a atividade a pH 7 e 8. Com relação à temperatura, ambas lipases foram estáveis abaixo de 40°C. Suas atividades foram parcialmente perdidas (40%) após 10 minutos de incubação a 60°C e totalmente destruídas a 80°C. A lipase II foi mais sensível aos íons Hg^{++} e

Ag^+ que a lipase I. O maior efeito inibidor para a lipase I foi observado com Ag^+ e Iodoacetamida.

MUDERHWA *et alii*, em 1985 (40), purificaram a lipase extracelular de *Candida deformans* CBS 2071. Esta enzima foi escolhida por ser altamente específica para as posições 1 e 3 do triglicerídeo e assim poderia ser aplicada para hidrolisar óleo de palma eliminando ácido palmítico que está na posição extrema do triglicerídeo. A lipase purificada teve seu peso molecular estimado em 207.000, temperatura ótima de 40 a 50°C e pH ótimo de 7. Os íons bivalentes Ca^{++} , Mg^{++} e Co^{++} aumentaram a atividade da enzima, enquanto Cu^{++} , Zn^{++} e Fe^{++} inibiram-na fortemente. A inibição da enzima na presença de EDTA indicou que a enzima é dependente de um cofator no seu sítio ativo. Os reagentes ligadores de grupos tiólicos tais como iodoacetamida, paracloromercuribenzoato (PCMB) inibiram a enzima, indicando a presença do grupo -SH no sítio ativo da enzima.

FUJII *et alii*, em 1986 (16), relataram o efeito da lipase de *Candida rugosa* na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão, visando a aplicação de lipases em detergentes para lavanderia. Foi verificado que a remoção do óleo aumentou quando a concentração de lipase aumentou, na presença de tensoativos. A temperatura mais adequada da água de lavagem foi de 37°C que é a temperatura ótima da lipase. Com relação ao tipo de agente tensoativo, a lipase foi mais efetiva em tensoativos não iônicos que em iônicos.

NISHIO *et alii*, em 1987 (46), estudaram a especificidade de substrato e o modo de ação da lipase de *Pseudomonas fragi* 22.39B. Foram testados vários ésteres de ácidos graxos na presença e na ausência de íons de cálcio. A lipase hidrolisou não somente triglicerídeos mas também ésteres sintéticos como metiloleato e Tween. A adição de cálcio para a mistura de reação promoveu a hidrólise destes substratos. O efeito do tamanho da cadeia do ácido graxo na hidrólise de triglicerídeos saturados foi estudado, sendo obtido que os triglicerídeos de cadeia curta foram hidrolisados mais rapidamente, cerca de 3,2 mais

rapidamente que trioleína na presença de íons cálcio. A adição de íons cálcio para a mistura de reação não afetou a taxa de hidrólise para triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia média ou curta como C₄, C₆, C₁₀, C₁₂, mas afetou a taxa de hidrólise para triglicerídeos de cadeia longa C₁₄, C₁₆. A análise dos produtos de hidrólise de trioleína por cromatografia em camada delgada (CCD) indicaram que a lipase de *Pseudomonas fragi* tem especificidade para as posições 1,3 do triglicerídeo.

No mesmo ano, NISHIO *et alii* (47), purificaram a lipase produzida por *Pseudomonas fragi* 22.39B e estudaram algumas propriedades da enzima. A enzima purificada apresentou peso molecular de 33.000, ponto isoeletrico de 6,9. A enzima foi mais ativa a pH 9,0 e estável numa faixa de pH de 6,5 a 10,5 a 30°C e de 8,0 a 10,5 a 50°C após 24 horas de incubação, sendo portanto estável em solução alcalina. A lipase de *Pseudomonas fragi* mostrou-se estável à temperatura abaixo de 50°C a pH 9 por 24 horas tendo ótima termoestabilidade até 51°C.

NAIR & BONE, em 1987 (43), estudaram as condições ótimas para a produção de lipase de *Aspergillus foetidus* em meio líquido. Verificaram que o óleo de oliva na concentração de 2% e sacarose a 0,5% no meio de cultura aumentou a produção de lipase. A aeração do meio de cultivo foi também um fator importante para a produção de lipase, sendo encontrada uma produção máxima da enzima com agitação de 500 rpm.

YAMAMOTO *et alii*, em 1988 (81), isolaram uma linhagem de bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas* e estudaram as condições de cultivo para a produção de lipase. Neste estudo, utilizando vários óleos e gordura animal e vegetal como fontes de carbono, verificaram o aumento da produção de lipase, quando se utilizou óleo de oliva como única fonte de carbono. A lipase obtida foi fracionada com sulfato de amônio e purificada. A enzima purificada apresentou pH e temperatura para a hidrólise de óleo de oliva de 7 e 60°C, sendo estável até 37°C em pH 7 e também estável na faixa de pH 9 a 10 a temperatura de 4°C por 22

horas. A atividade enzimática aumentou na presença de sais de bile e surfactantes aniônicos. O substrato mais facilmente hidrolisado pela enzima foi o óleo de mamona.

PAPON & TALON, em 1988 (56), estudaram as condições de cultivo e produção de lipase por 3 linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (*Lactobacillus curvatus* A 8 R126, *Lactobacillus carnis* LV 31 e *Lactobacillus sake* C3RV2F1) e *Brochotrix thermosphacta* ATCC 11509. A atividade lipolítica das linhagens de *Lactobacillus* e *B. thermosphacta* foram ligadas à célula, não sendo encontrada nenhuma atividade lipolítica significativa no líquido extracelular. A temperatura ótima de crescimento e produção de lipase foram respectivamente 24°C para *B. thermosphacta* e 30°C para as 3 linhagens de *Lactobacillus*. Para todas as linhagens, o pH inicial de 7 e baixa concentração de glicose (0,5 a 1,0 g/L) no meio de cultura, foram os fatores que estimularam a produção da lipase. Quando tributirina foi adicionada no meio de cultivo, na concentração de 0,1%, foi observado um efeito inibidor da produção de lipase por *B. thermosphacta* com uma diminuição de 46% de atividade. Para as linhagens de *Lactobacillus*, houve uma queda de 19 a 40% da produção de lipase na presença de tributirina na concentração de 1%. A adição de ácido butírico na concentração de 0,1% e condições anaeróbias de cultivo, inibiram a produção de lipase , no entanto, estes fatores não afetaram a produção da enzima por *B. thermosphacta* e *Lactobacillus*.

PAPON & TALON, em 1989 (57), isolaram e caracterizaram lipases de bactérias pertencentes ao gênero *Brochotrix thermosphacta* e *Lactobacillus curvatus* presentes em leite. Estes microrganismos produziram lipases intracelularmente. O pH ótimo de atividade das 2 enzimas apresentou-se na faixa de 6,5 a 37°C. Ambas lipases apresentaram estabilidade térmica na faixa de 4 a 30°C . A lipase de *Lactobacillus curvatus* foi estável a pH na faixa de 4 a 11, enquanto que a lipase de *B. thermosphacta* foi inativada a valores de pH inferiores a 5 e em

pH maior que 9. Dos vários substratos testados como tributirina, tricaproína, tripalmitina e trioleína, a máxima atividade encontrada foi em tributirina e a hidrólise de outros triglicerídeos diminuiu na proporção em que ocorria o aumento de carbono na cadeia do ácido graxo.

PARK & PASTORE, em 1989 (58), descreveram estudos de esterificação de ácido graxo e glicerol por lipases microbianas. A esterificação de ácido oléico com glicerol foi estudada utilizando lipases produzidas por *Penicillium roquefort*, *Rhizopus delemar* e *Rhizopus niveus*. Observou-se esterificação máxima quando a mistura de reação continha 0,9 g de ácido oléico, 8 g de glicerol e 0,4 mL de água contendo a lipase com mistura incubada a 40°C. A lipase de *P. roquefort* esterificava em menor tempo, comparativamente formando monoglicerídeos, 1,2 (2,3) diglicerídeos, 1,3- diglicerídeo e não formava triglicerídeo. As lipases de *R. delemar* e *R. niveus*, demonstraram forma similar de esterificação, formando todos os glicerídeos, inclusive triglicerídeos, que a lipase de *P. roquefort*.

ESPINOSA *et alii*, em 1990 (12), estudaram alguns efeitos nutricionais no meio de cultura que afetam a produção de lipase por *Rhizopus delemar*. Os autores encontraram que a enzima produzida por *R. delemar* podia ser utilizada como agente flavorizante na produção de produtos de laticínios modificados. Foi verificado que dextrina foi a melhor fonte de carbono, quando utilizada na proporção de 1% e extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio. Quando 2% de óleo de oliva foi adicionado no meio de cultivo, um aumento de 84,5% na atividade lipolítica foi observado. A presença de Tween 80, no meio de cultura, estimulou a liberação da enzima e o aumento da atividade lipolítica.

IIZUMI *et alii*, em 1990 (21), purificaram e caracterizaram a lipase termoestável de uma nova linhagem do gênero *Pseudomonas*, a qual foi identificada como *Pseudomonas sp* KWI-56. A enzima foi purificada 13,9 vezes por precipitação em acetona 60% (v/v) e filtração em gel com coluna TSK gel G 3000 SW, obtendo no final 2,9% de recuperação. A lipase purificada apresentou uma

única banda na eletroforese em gel SDS-PAGE e um peso molecular de 33.000. O pH ótimo de atividade da enzima purificada foi na faixa de 5 a 7 e o pH de estabilidade na faixa de 4 a 10 a 30°C. A enzima estudada, mostrou ser termoestável, perdendo apenas 4% de atividade quando incubada a 60°C por 24 horas, retendo ainda 76% de atividade lipolítica quando incubados a 70°C por 3 horas. A atividade lipolítica da enzima foi fortemente inibida na presença de íons Cu^{+2} , Hg^{+2} , Sn^{+2} e Zn^{+2} , sendo que o íon Ca^{+2} não afetou significantivamente a atividade enzimática. Surfactantes aniônicos como SDS (sódio lauril sulfato) e LBS (sódio lauril benzenesulfonato) inibiram fortemente a enzima. Por outro lado, a lipase de *Pseudomonas sp* KWI-56, foi estável na presença de solventes orgânicos como: acetona, metanol, e etanol no sistema de reação. Em relação a especificidade de substrato, foi encontrado que ésteres de ácidos graxos de cadeia média C_{10} e C_{14} , foram os substratos preferencialmente hidrolisados pela enzima purificada. Tricaprilina, trimistirina e os óleos de soja,oliva e côco foram os substratos mais eficientemente hidrolisados pela enzima.

BAILLARGEON & MAC CARTHY, em 1991 (3), estudaram as características bioquímicas da lipase de *Geotrichum candidum* NRRL -Y 553. Os autores verificaram que a lipase produzida por *G. candidum* é composta por uma mistura complexa de proteínas de peso molecular , pI e especificidade variados. A lipase de *G. candidum* NRRL-Y553 consiste de 5 espécies glicosiladas com peso molecular variando de 57 Kda a 64 Kda. As lipases de *Geotrichum candidum* são similares em pI e peso molecular em relação às lipase de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 e lipase *Geotrichum candidum* (GC20) comercial . No entanto, a especificidade das lipases é variável, sendo que a lipase de *Geotrichum candidum* ATCC 34614 tem pouca afinidade a ácidos graxos 18: 1 e ácidos graxos 16:1, enquanto a lipase de *G. candidum* Y- 553 produz lipase mais específica para 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.

SUGIHARA *et alii*, em 1991 (67), purificaram a lipase produzida por *Bacillus sp* e estudaram as características bioquímicas da enzima. A enzima foi purificada em DEAE Sephadex A-50, Toypearl HW 55 F e Butyl Toyopearl 650 M. Foi encontrado que a lipase de *Bacillus sp* é uma proteína monomérica de peso molecular de 22.000 e pI de 5,1. O pH ótimo encontrado para a enzima purificada foi na faixa de 5,5 a 7,2 a 30 °C e a temperatura ótima encontrada foi de 60°C, quando o óleo de oliva foi utilizado como substrato. Em relação à especificidade de substrato, a enzima demonstrou uma grande preferência para as ligações 1 e 3 do triglicerídeo. Neste estudo, os autores verificaram que a adição de solventes orgânicos como acetona no sistema de reação numa concentração de 0 a 60% (v/v) aumentou a atividade lipolítica, enquanto que n- hexano, teve um efeito inibidor na reação enzimática.

SUGIHARA *et alii*, em 1991 (66), estudaram as características bioquímicas de 4 lipases isoladas de *Geotrichum candidum*. Na purificação realizada em DEAE- Sephadex A-50 e filtração em gel G- 100. , os autores encontraram 4 picos de atividade. Em eletroforese em SDS- PAGE, as lipases I e IV apresentaram uma única banda com peso molecular de 66.000 e 58.000 respectivamente. Foi encontrado que a lipase I foi responsável por 84% da atividade total e a lipase IV respondeu por 1,4% da atividade total. Em relação à especificidade de substrato , a taxa lipolítica foi maior para a lipase I em tricaprilina e trioleína. Por outro lado, a lipase IV apresentou baixa atividade em tricaprilina e maior atividade em metil - oleato. Ambas enzimas hidrolisaram todos os ésteres metílicos, exceto metil-oleato. Verificou-se neste experimento que, quando trioleína foi utilizada como substrato para a lipase I, a quantidade de 1,2 (2,3) dioleína formada foi de 18% ,sendo 2,2 maior que 1,3 dioleína. A lipase IV reagiu de diferente modo, produzindo 1,3 e 1,2 (2,3) dioleína num total de 19% .

Uma nova enzima que hidrolisa mono e diacilglicerol produzida por *Penicillium camembertii* foi isolada e estudada quanto às suas características

bioquímicas por YAMAGUCHI & MASE, em 1991 (80). A lipase extracelular de *Penicillium camembertii* foi separada em 2 formas (A e B) e seu peso molecular foi de 37.000 e 39.000 respectivamente. A composição aminoacídica e a sequência terminal foram semelhantes. A lipase B, a maior fração encontrada, foi purificada aproximadamente 210 vezes com uma recuperação de 2,6%. Foi verificado que a lipase B foi específica aos substratos mono e diacilglicerol e hidrolisou mais eficientemente monoacilglicerois de cadeia longa. Triglicerídeos foram completamente inertes como substrato para estas enzimas. Os autores observaram que no curso da hidrólise, a lipase B clivou preferencialmente a posição α do monoacilglicerol. Os íons Fe^{+++} e Hg^{++} inibiram significativamente a lipase de *Penicillium camembertii* U- 150.

SHAW *et alii*, em 1991 (63), realizaram estudos com a lipase imobilizada de *Pseudomonas sp.* A lipase imobilizada em celite, foi utilizada para catalisar a alcoólise de triglicerídeos compostos de ácidos graxos de cadeia longa na presença de etanol e isopropanol na produção dos respectivos ésteres à baixa temperatura de reação. Observou-se que o grau de alcóolise quando tripalmitina em isopropanol, foi utilizada como substrato, foi maior que na presença de etanol, enquanto que a reação oposta foi observada para o substrato trioleína. A conversão final do triglicerídeo obtida da isopropanólise foi maior que a obtida na etanólise. A lipase imobilizada em celite pareceu ser mais estável em condições de mistura quando o solvente da reação foi o isopropanol, se comparadas à etanólise.

RAPP & BACKHAUS, em 1992 (60), isolaram um total de 700 linhagens compreendidas entre fungos filamentosos, levedura e bactérias de coleção de cultura com o objetivo de selecionar microrganismos potencialmente produtores de lipase e portanto, capazes de hidrolisar trioleína durante o crescimento em meio de cultura contendo Tween 80. No meio de cultura utilizado para a detecção de atividade lipolítica foram adicionados Tween 80 e trioleína concentrações de 0,25% (p/v) e 0,75% (p/v) e a seguir emulsificados. Os microrganismos que apresentaram

zonas claras ao redor da colônia, foram selecionados e cultivados por fermentação submersa em 20 ml de meio basal composto por: 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g/L de KH_2PO_4 , 3g/L de NaNO_3 , 1g/L de extrato de levedura, 30g/L de peptona e 1% de glicose como fonte de carbono e incubados em shaker com agitação de 120 rpm a 27° C por 72 horas. Uma amostra de 10 mL da cultura foi inoculada em 250 mL do meio basal contendo 1% de óleo de oliva como fonte de carbono e cultivados a 30°C nas mesmas condições descritas acima. Dos microrganismos testados, 34 linhagens de fungos filamentosos foram selecionadas e cultivadas em meio basal contendo 1% de óleo de oliva. O melhor produtor de lipase encontrado foi o fungo pertencente ao gênero *Rhizopus sp*, sendo que a melhor atividade lipolítica encontrada foi de *Rhizopus circinas*, com 44U/mL após 72 horas de incubação, seguido por *R. microsporus* com aproximadamente 39 U/mL. Um total de 15 bactérias e 21 leveduras nas quais foi detectada atividade lipolítica em meio trioleína/ Tween 80 ágar , foram selecionadas e inoculadas em meio basal contendo 1% de óleo de oliva e incubadas em agitador a 120 rpm. A maior atividade lipolítica (10 U/mL) foi da levedura pertencente ao gênero *Rhodotorula rubra* DSM 70825 após 72 horas de incubação. A bactéria que produziu lipase com maior atividade (16 U/mL) foi *Pseudomonas cepacia*, após 96 horas de incubação.

CHEN *et alii*, em 1992 (6), isolaram microrganismos produtores de lipase, de solo de vários locais, utilizando no meio de cultura, óleo de oliva como única fonte de carbono. Destes microrganismos, uma levedura pertencente à classe dos deuteromicetos foi o melhor produtor de lipase extracelular, a linhagem WUC -12 foi identificada como *Trichosporon fermentans*, de acordo com as suas propriedades taxonômicas e morfológicas. Em relação às condições de cultivo, verificou-se que quando o microrganismo foi cultivado a 30°C por 4 dias em meio contendo 8% água de maceração de milho e 3 % de óleo de oliva (v/v)como fonte de carbono, *T fermentans* WUC-12 produziu 126 U/mL de lipase extracelular. Embora a produção de lipase tenha aumentado para 400 U/mL pela adição de 2 %

de glicose no meio contendo "corn steep liquor" (água de maceração de milho), a linhagem de *T. fermentans* WV C 12 produziu 34 U/mL de lipase em meio contendo 2% de glicose no lugar de 3% (v/v) óleo de oliva. Por outro lado, *T. fermentans* WU C 12 cresceu e produziu lipase no meio contendo n- parafina como fonte de carbono.

SHIMADA *et alii*, em 1992 (64), estudaram a produção da lipase de *Geotrichum candidum* em meio de cultivo contendo "corn steep liquor " (água de maceração de milho) 5% e NH_4NO_3 0,5% como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente. Vários ácidos graxos, triglicerídeos de cadeia saturada e insaturada e seus ésteres metílicos foram adicionados ao meio de cultivo e incubados por 50 horas. Verificou-se que a produção de lipase foi induzida por óleo de oliva, óleo de soja, óleo de oliva, trioleína, ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia longa tais como: ácido oléico, linoléico, palmítico, mirístico, láurico e cáprico. No entanto, os autores verificaram que os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia longa e saturada no meio de cultivo e seus ésteres não induziram a produção da lipase.

Foi verificado diferentes graus de hidrólise pela lipase de *Brochotrix thermosphacta*, nos estudos realizados por TALON *et alii*, em 1992 (70), em diferentes substratos emulsificados com goma arábica 10% (v /v). Ao sistema de reação foi adicionada a lipase de *Brochotrix thermosphacta* e incubado por 24 horas à baixa temperatura. Os ácidos graxos livres liberados foram analisados por cromatografia gasosa. Os resultados encontrados pelos autores foram, que os 2 substratos com alto teor de ácidos graxos insaturados como gordura de porco e óleo de linhaça foram mais rapidamente hidrolisados que gordura bovina e de carneiro. A lipase de *B. thermosphacta* liberou preferencialmente ácido linoléico de óleo de linhaça e ácido oléico de gordura de porco e de carneiro. Durante a lipólise das gorduras de origem animal, os autores observaram a liberação de ácido palmítico em maior quantidade .

KHEIROLOMOON *et alii*, em 1992 (26), estudaram uma lipase lipoproteica presente na membrana celular da bactéria pertencente ao gênero *Pseudomonas sp.* A lipase de *Pseudomonas sp* foi purificada e seu peso molecular foi de 134.000. A especificidade da enzima foi verificada em vários ésteres de ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e grau de insaturação. A preferência posicional da lipase lipoproteica foi extensamente estudada usando como substrato os triglicerídeos: Trioleína (OOO), 1,3 diestearoil - 2- oleoilglicerol (SOS) e 1,2 dipalmitoil-3- oleoilglicerol (PPO). A lipase de *Pseudomonas sp*, apresentou preferência específica para clivagem das posições 1,3 do triglicerídeo, enquanto a sua atividade em relação à posição 2 foi de 1/3 da atividade presente nas posições 1 e 3. A especificidade a ácidos graxos pela lipase foi estudada através da determinação da atividade em relação a 4 diferentes composições de ácidos graxos na posição 1 ou 3 dos triglicerídeos: 1- palmitoil-2-oleoil- 3-estearoilglicerol (POS) e 1,2 dimestearoil- 3-oleoil-rac-glicerol (MMO). Uma completa hidrólise foi observada em relação ao ácido palmítico e esteárico, no entanto, um total de 65% de hidrólise foi observado em ácido mirístico e oléico. Estes resultados podem indicar uma inibição competitiva de ácidos graxos de cadeia média e insaturados.

DUPUIS *et alii*, em 1993 (10), estudaram a atividade da lipase de uma bactéria láctica pertencente ao gênero *Propionibacterium freudenreichii sbsp. freudenreichii*, utilizada frequentemente em indústrias de laticínios, na maturação de queijos tipo Suíço. Os autores detectaram atividade de lipase e esterase de 8 linhagens de bactérias lácticas do gênero *Propionibacterium*. A atividade lipolítica foi detectada intracelularmente e no líquido sobrenadante da cultura. O maior valor de atividade foi expresso a 45°C em pH 6,8. A atividade de esterase também foi detectada no meio de cultura. O substrato específico à melhor ação foi dependente de cada esterase, embora não houvesse atividade significativa em substratos com cadeias maiores que C₄.

MUKESH *et alii*, em 1993 (41), realizaram estudos envolvendo a transesterificação de óleo de mamona catalisada por lipase, utilizando n- butanol no sistema de reação obtendo como produtos mono e diglicerídeos e butil- ésteres. Foi verificado nesse experimento, que n- butanol teve efeito inibidor na reação e que a quantidade de solvente no sistema de reação influenciou a taxa da reação e distribuição dos produtos, porém com o aumento da concentração da enzima foi detectado um aumento da taxa de reação e a alteração na distribuição dos produtos.

MUSTRANTA *et alii*, em 1993 (42), realizaram estudos com lipases de microrganismos pertencentes ao gênero *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger* e *Pseudomonas fluorescens*. As lipases referidas foram imobilizadas por adsorção em resina de troca iônica e terra diatomácea, usando tampão ou hexano como meio de reação. As preparações enzimáticas foram testadas na transesterificação de trioleína com ácido láurico frente a diferentes álcoois. A lipase imobilizada de *Candida cylindracea* foi mais ativa, quando hexano foi utilizado como meio de reação e a resina de troca iônica foi melhor suporte que terra diatomácea. A solução de hexano mostrou ser o melhor meio para a lipase de *Aspergillus niger*, o que também foi verificado para a lipase de *P. fluorescens*.

CHEN *et alii*, em 1994 (7), purificaram e estudaram as características da lipase extracelular de *Trichosporun fermentans* WUC-12. A lipase de *T. fermentans* foi purificada por precipitação em sulfato de amônio e sucessivas cromatografias em coluna Butyl Toyperail 650M, Toypearil HW 55 F e L Sepharose. Nesta purificação foram encontradas 2 tipos de lipase (I e II). O peso molecular da lipase I foi de 55 kDa em eletroforese SDS -PAGE e 160 KDA em filtração em gel, enquanto que a lipase II foi de 55 KDA em SDS - PAGE e 64 KDA em filtração em gel. Para a hidrólise de óleo de oliva, a temperatura e o pH ótimo para as 2 lipases foram de 5,5 e 35°C respectivamente. As lipases apresentaram estabilidade após incubação a 30°C por 24 horas em pH na faixa de 4 a 8. A termoestabilidade da lipase I por 30 minutos em pH 5,5 foi acima de 40°C,

enquanto que a lipase II nas mesmas condições descritas, foi ao redor de 50°C. Ambas lipases foram capazes de hidrolisar as posições 1,2 e 3 da trioleína. Estes resultados indicam que as lipases I e II não são específicas quanto à posição no triglicerídeo.

OHNISHI *et alii*, em 1994 (49), estudaram a produção de lipase de *Aspergillus oryzae*. Nos estudos relativos à produção da lipase por *Aspergillus oryzae*, os autores verificaram um aumento da produção da enzima (0,48 U/mL) em meio GYP composto por: 2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 2% de peptona, em relação ao meio sólido (0,05 U/mL). As condições de cultivo, como pH, composição o meio e temperatura, foram estudadas. Foi encontrado que a 28°C e adição de 3% de óleo de soja no meio GYP modificado, a produção de lipase aumentou para 0,78 U/mL. Em estudos realizados em fermentador, 30 U/mL da atividade lipolítica foi obtida após 72 horas de incubação a 28°C nas condições apropriadas. A produção de lipase foi grandemente influenciada pela temperatura, sendo a temperatura ótima para a produção de lipase 24°C.

HOU em 1994 (20), selecionou 1229 microrganismos entre bactérias, fungos e leveduras, quanto a produção de atividade lipolítica. Os microrganismos foram isolados em meio de cultura em placa contendo rodamina B, como indicador de atividade lipolítica. Dos microrganismos testados, 25% apresentaram atividade lipolítica. As linhagens que apresentavam zonas claras ao redor da colônia foram selecionadas e classificadas de acordo com a faixa de pH e a termoestabilidade das atividades lipolíticas encontradas. As lipases microbianas estudadas neste experimento, foram divididas em três grupos: a) lipases ativas a pH ácido, na faixa de 5,5 a 7 produzidas por 36 bactérias e 23 leveduras e 4 actinomicetos; b) lipases ativas em pH maiores ou igual à 7,5 foram produzidas por 17 linhagens de bactéria, 4 linhagens de levedura, 2 linhagens de actinomicetos e uma linhagem fúngica; c) lipases ativas tanto em pH 5,5 quanto em pH 7,5 foram produzidas por 112 linhagens bacterianas, 90 linhagens de leveduras, 15 linhagens de actinomicetos e 5

linhagens fúngicas. Quando o isolamento de microrganismos foi realizado à 60°C, em pH 9, foram selecionadas e identificadas 50 linhagens bacterianas e 26 linhagens de leveduras que produziram lipases alcalinas e termoestáveis.

NAKA & NAKAMURA, em 1994 (44), reportaram os estudos referentes aos efeitos de colipase, um cofator proteico da lipase pancreática, sais de bile, Na^+ e Ca^{++} na atividade da enzima. Os efeitos de sais de bile na atividade da lipase pancreática foram verificados frente aos substratos trioleína e tributirina. Embora a atividade da lipase pancreática em tributirina tenha sido inibida por glicodesoxicolato de sódio (GDC-Na), taurocolato de sódio (TDC-Na) e glicolato de sódio (GC-Na), foi observada uma acentuada ativação por todos estes compostos, quando trioleína foi utilizada como substrato. Os efeitos da colipase e do taurocolato de sódio na atividade da lipase pancreática foram também investigados, tanto na presença como na ausência dos sais NaCl e CaCl_2 . Os autores verificaram que na ausência de NaCl e CaCl_2 a atividade da lipase pancreática foi inibida por 4 mM de taurodesoxicolato de sódio em tributirina, tendo porém a sua atividade restituída com a adição de colipase no meio de reação. Por outro lado, a lipase foi fortemente ativada por 4 mM de taurodesoxicolato no substrato trioleína, não ocorrendo a ativação adicional por colipase. A lipase pancreática foi ativada por colipase na presença de taurodesoxicolato de sódio, somente quando o substrato foi tributirina.

BHUSHAN & HOODAL, em 1994 (4), isolaram e caracterizaram a lipase produzida por uma levedura alcalofílica identificada como *Candida* BG - 55. A lipase apresentou temperatura e pH ótimo de 40°C e 8,5 respectivamente, apresentando estabilidade térmica quando incubada a 45°C por 4 horas. A atividade da lipase foi fortemente ativada na presença de íons Ni^{++} e Ca^{++} na concentração de 10 mM, por outro lado, os íons Fe^{++} e Fe^{+++} na concentração de 10 mM inibiram significativamente a atividade lipolítica da enzima.

FU *et alii*, em 1995 (15), realizaram estudos referentes a hidrólise de óleos e gorduras pela lipase de *Aspergillus sp.* A enzima hidrolisou os substratos: óleo de oliva, óleo de soja, óleo de palma, gordura de côco, toucinho, sendo encontrado porém, maior porcentagem de hidrólise para os óleos de soja e oliva. A temperatura e pH ótimo para a atividade lipolítica foi de 37°C e 6,5 a 7 respectivamente. A lipase foi ativada por íons Ca^{++} , mas inativada por solventes orgânicos como isopropanol e propanona.

LIN *et alii*, em 1995 (33), estudaram os efeitos de Triton X 100 (isoetil fenil polioxietileno) na produção de lipase alcalina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. A linhagem de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111, foi isolada do solo, utilizando placas de ágar contendo rodamina B e Na_2CO_3 . Para a produção de lipase foi utilizado meio de cultura composto por: 0,5 % de extrato de levedura, 0,5 % de peptona, 0,2% de K_2HPO_4 , 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1% de Na_2CO_3 . Os autores verificaram que a adição de 0,2% de óleo de oliva, 1 % de farinha de soja, 0,2% de Triton X- 100 e íon sódio, foram essenciais para a produção da enzima, sendo que a adição de Triton X- 100 aumentou a atividade lipolítica em 50 vezes.

PABAI *et alii*, em 1995 (53), isolaram e caracterizaram a lipase parcialmente purificada de *Pseudomonas fragi* CRDA 323. A linhagem de *Pseudomonas fragi* CRDA 323, foi isolada utilizando placas de ágar contendo rodamina B como indicador de atividade lipolítica. Para a produção da lipase foi utilizada a fermentação em meio líquido. A lipase foi precipitada pela acidificação do sobrenadante da cultura a pH 4 com HCl e parcialmente purificada com sulfato de amônio. A maior atividade lipolítica (42 %), foi obtida na fração IV, precipitada com 20 a 40 % de saturação, obtendo uma purificação de 19 vezes. A fração IV que apresentou pH ótimo de 8,5, foi utilizada para a interesterificação de gordura de manteiga em sistema de microemulsão contendo Span 60 (sorbitol monoestearato) e Tween 80 (polioxietileno sorbitan monoestearato) na proporção de 48 : 52 (v/v). Os autores verificaram que a interesterificação da gordura de

manteiga resultou na diminuição de ácidos graxos de cadeia longa e saturada (C_{12} , C_{14} e C_{16}), ao mesmo tempo foi verificado um aumento de $C18 : 0$ e $C18 : 1$ na posição sn-2 do triglicerídeo selecionado.

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material:

3.1.1. Reagentes e Materiais Específicos:

Reagentes químicos: ácidos, bases, sais minerais, solventes orgânicos, Triton X-100 (MERCK, RIEDEL, ECIBRA ou equivalente).

Reagentes específicos: soroalbumina, Indicadores: azul de timol, fenoltaleína, Victória blue, Sudan IV, goma arábica, álcool polivinílico (PVA), (REAGEN, MERCK, ECIBRA), desoxicolato de sódio, polifosfato tetrasódico (STPP), detergente de marca comercial

Ácidos graxos: ácido láurico, ácido butírico, ácido oléico, ácido palmítico, ácido esteárico (RIEDEL e SIGMA)

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

Meios de cultura: ágar, peptona, extrato de levedura (DIFCO), caldo nutriente e ágar nutriente (MERCK), corn steep liquor (água de maceração de milho) comercial.

Meios de cultura específicos: para identificação de bactérias (DIFCO)

Carboidratos: glicose, sacarose, lactose, maltose, frutose, arabinose, sorbitol, manitol, xylose (MERCK).

Enzimas : Lipase de *Alcaligenes sp*, obtida no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Lipase comercial, Protease (Texchem)

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

Placas de vidro para cromatografia em camada delgada (CCD) 20x 20cm, sílica gel G- 60 art. 1.07731, MERCK.

Aplicador Desaga para preparo de placas para cromatografia em camada delgada.

Padrões de Proteína: Para eletroforese em gel SDS, Pharmacia.

Contendo as proteínas:

1. Albumina de soro bovino	PM 67.000 daltons
2. Albumina de ovo	PM 43.000 daltons
3. Quimotripsina	PM 25.000 daltons
4. Ribonuclease A	PM 13.700 daltons

3.1.2. Equipamentos

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

Sistema de ultrafiltração em membrana mod. TCF2A (Amicon Co)

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Isolamento de microrganismos

Foram isoladas linhagens de bactérias provenientes de amostras de solo, água, verduras e frutas de diversas regiões do Brasil. As amostras foram colhidas e acondicionadas em sacos plásticos, com espátulas e pipetas estéreis.

Para o cultivo dos microrganismos, as amostras foram diluídas em 10mL de água destilada estéril, homogeneizadas e deixadas em repouso por 30 minutos aproximadamente.

O líquido sobrenadante, foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura esterilizado, composto de: 2% de óleo de oliva, 0,1% de sulfato de magnésio, 0,2% de uréia, 0,5% de sulfato de amônio, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de cloreto de sódio, 1,5% de ágar. O pH foi ajustado a 8,5-9 com 0,5% de carbonato de sódio. No meio foi acrescentado o indicador "Victoria blue" na concentração de 0,0005%. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C até o crescimento satisfatório das colônias. As colônias que produziram halo azul, indicando mudança de pH ao redor da colônia foram selecionadas .

Os microrganismos positivos, foram transferidos para tubos de ensaio contendo o mesmo meio inclinado e incubados à mesma temperatura de crescimento, estocados a 5°C e testados quanto a presença de atividade lipolítica.

3.2.2 Pré seleção de microrganismos

3.2.2.1 Preparo da suspensão bacteriana para a fermentação

A suspensão bacteriana foi preparada, incubando-se as linhagens selecionadas por 72 horas a 37°C, em tubos inclinados contendo meio de cultura preparados conforme item 3.2.1. Após a incubação, foram adicionados aos tubos de cultura 10 mL de água destilada esterilizada e a superfície do meio de cultura foi raspada com auxílio de alça de níquel- cromo estéril.

3.2.2.2 Fermentação Líquida

Para a produção de lipase alcalina, as linhagens isoladas foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo meio de cultura composto de 1% de água de maceração de milho, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, 2% de farinha de soja torrada e 0,2% de carbonato de sódio, pH 9. Os frascos foram inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana preparada de acordo com o item 3.2.2.1 e incubados a 30°C com agitação de 200 rpm por 72 horas.

Após a incubação, o conteúdo dos frascos foi centrifugado por 15 minutos a 10000 rpm a temperatura de 10°C. A atividade lipolitica foi determinada no sobrenadante.

3.2.3 Seleção de linhagens produtoras de lipase

As linhagens de nº 127, 198, 212, 441 e 511 pré- selecionadas, foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo meio de cultivo composto de : 2% de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, 0,5% de K_2HPO_4 , 1% de

água de maceração de milho, o pH foi ajustado para 9 com 0,2% de Na₂CO₃. Os frascos foram incubados a 30°C com agitação de 100 rpm por 24, 48 e 72 horas.

Após o desenvolvimento das culturas, os meios foram centrifugados à 10.000 rpm a temperatura de 10°C, por 15 minutos. No sobrenadante foi determinada a atividade lipolítica, como descrito no item 3.2.8.

3.2.4 Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica de *Alcaligenes sp.* - linhagem nº212 e conservação da cultura.

O microrganismo selecionado no estudo como melhor produtor de lipase alcalina foi classificado no gênero *Alcaligenes sp.* de acordo com as características bioquímicas e morfológicas descritas no “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” vol 1 (30) e denominado *Alcaligenes sp.*- linhagem nº212.

Para a manutenção da cultura, a linhagem foi cultivada em meio Ágar Nutriente por 48 horas. Após a incubação foi adicionado 8 mL de vaselina líquida estéril e a cultura foi conservada à temperatura de 10°C.

3.2.5 Estudo do sistema de reação para a determinação da atividade lipolítica

Para o estudo do melhor sistema de reação para a determinação da atividade lipolítica da linhagem selecionada foram testados vários sistemas de reação, visando uma adequação da metodologia para a realização do presente trabalho.

3.2.5.1 Determinação da atividade lipolítica utilizando Goma Arábica

Em Erlenmeyer de 125 mL foram misturados 4 mL de tampão Tris-HCl pH 9,0 0,2M, 1 mL de solução de CaCl_2 110 mM e 5 mL da emulsão composta de 75 mL de goma arábica 7% e 25 mL de óleo de oliva e 1 mL de solução enzimática. Esse sistema foi incubado a 40°C em banho- maria termostatizado por 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05 M, utilizando azul de timol como indicador.

3.2.5.2 Determinação da atividade lipolítica utilizando Desoxicolato de Sódio

Em Erlenmeyer de 125 mL foram misturados 5 mL da emulsão composta de: 0,25 g de desoxicolato de sódio, 40 mL de tampão Tris-HCl pH 9,0 a 0,2M, 10 mL de solução de CaCl_2 e 10 g de óleo de oliva, devidamente homogeneizados. A esse sistema de reação foi adicionado 1 mL de solução enzimática. O sistema de reação foi incubado a 40°C em banho- maria termostatizado com agitação de 300 rpm por 15 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona-etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres foram titulados contra solução de NaOH 0,05M, utilizando azul de timol como indicador.

3.2.5.3 Determinação da atividade lipolítica sem Emulsificante

Em Erlenmeyer de 125 mL foram acondicionados 1 g de óleo de oliva, 4 mL de tampão Tris- HCl pH 9,0 0,2 M, 1mL de solução de CaCl_2 110 mM e 1 mL de solução enzimática. A reação foi incubada a 40°C por 15 minutos em banho-

maria termostatzado. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona - etanol (1:1 v/v). Os ácidos graxos livres liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M aquoso, utilizando-se azul de timol como indicador.

3.2.5.4 Determinação da atividade lipolítica utilizando-se Álcool Polivinílico como emulsificante

Em Erlenmeyer de 125 mL foram misturados 4 mL de Tampão Tris-HCl pH 9 na concentração de 0,2M, 1 mL de CaCl_2 110 mM e 5 mL da emulsão composta de : 75 mL de álcool polivinílico 2% e 25 mL de óleo de oliva. Ao sistema de reação foi adicionado 1 mL de solução enzimática sendo a mistura incubada em banho -maria termostatzado por 15 minutos a 130 oscilações por minuto. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de solução de 15 mL de acetona - etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos livres foram titulados contra solução de NaOH 0,05 M aquoso, utilizando -se azul de timol como indicador .

Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima.

O cálculo de atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oleico x mL de NaOH 0,05M aquoso.

3.2.6 Estudo de parâmetros para a produção de lipase alcalina da linhagem n°212, selecionada como melhor produtora

3.2.6.1 Seleção do melhor meio de cultivo para a produção da lipase

A linhagem de bactéria selecionada foi testada nos seguintes meios de cultura:

3.2.6.1.1 Meio de cultura nº 1:

O meio de cultura 1 foi composto de 2% de amido de trigo, 2% de farinha de soja, 0,5% fosfato de sódio 0,5% de uréia, 0,5%. 0,5% sulfato de magnésio heptahidratado. O pH foi ajustado para 9 com 0,2%carbonato de sódio.

3.2.6.1.2 Meio de cultura nº 2 :

O meio de cultura 2 foi composto de 2% de farinha de soja, 1% de água de maceração de milho, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, sendo o pH ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio.

3.2.6.1.3 Meio de cultura nº3:

O meio de cultura 3 foi composto de 1% de água de maceração de milho, 1% de amido de trigo, 0,5% de fosfato bibásico de potássio e o pH foi ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio.

3.2.6.1.4 Meio de cultura nº4

O meio de cultura 4 foi composto de 2% de óleo de oliva, 2% de água de maceração de milho, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, 0,1% de sulfato de amônio, 0,1% de sulfato de magnésio heptahidratado. O pH foi ajustado para 9 com 0,2%de carbonato de sódio.

3.2.6.1.5 Meio de cultura nº5:

O meio de cultura 5 foi composto de 1% de água de maceração de milho, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, 1,5% de peptona, 1% de óleo de oliva. O pH foi ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio.

3.2.6.1.6 Meio de cultura nº6:

O meio de cultura 6 foi composto de 1% de água de maceração de milho, 1% de farinha de trigo, 0,5% de fosfato bibásico de potássio e 2% de farinha de soja torrada. O pH foi ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio.

Em frascos Erlenmeyers de 50 mL, foram adicionados 20 mL dos meios de cultura acima descritos e esterilizados. Os meios foram inoculados com as linhagens selecionadas e incubados por 72 horas em banho termostático com agitação de 200 rpm a 30°C. Após esse período centrifugou-se o conteúdo dos frascos e a atividade lipolítica foi determinada no sobrenadante.

3.2.6.2 Estudo da relação entre temperatura, tempo de incubação e produção da lipase

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 20 mL de meio de cultivo composto de: 1% de água de maceração de milho, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, 2% de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, o pH foi ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, os frascos foram inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana preparada de acordo com o item 3.2.2.1 e incubados nas

temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C em banho termostatizado com agitação de 200 rpm.. Em intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos, sendo a atividade lipolítica determinada no líquido sobrenadante de acordo com o item 3.2.8.

3.2.6.3 Estudo do efeito de ácidos graxos na produção de lipase da linhagem de *Alcaligenes sp.*

Em frascos Erlenmeyers de 50 mL foram adicionados 20 mL do meio de cultura nº6 composto de: 1% de farinha de trigo, 2% de farinha de soja torrada, 1% de água de maceração de milho, 0,5% de fosfato bibásico de potássio, o pH foi ajustado para 9 com 0,2% de carbonato de sódio. Para cada 20 mL de meio de cultura foram adicionados 1% dos seguintes ácidos graxo: palmítico, láurico, oléico e esteárico. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização os meios foram inoculados com as linhagens selecionadas e acondicionadas em banho termostatizado com agitação constante de 200 rpm a 30°C por 72 horas.

Após esse período, centrifugou-se os meios de cultura por 15 minutos a 10.000 rpm . A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante.

3.2.6.4 Estudos da da fonte de carbono na produção da lipase

3.2.6.4.1 Triglicerídeos

Para este estudo foi utilizado meio de cultura composto de: 4% de peptona, 0,2% de K₂HPO₄, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de NaCl, 0,02% de MgSO₄ e 2% das seguintes fontes de carbono: óleo de soja, óleo de oliva, óleo de arroz, óleo de milho, óleo de mamona. óleo de girassol, óleo de algodão, gordura de porco, gordura de côco, ácido oléico, ácido palmítico, ácido láurico e um controle,

no qual foi suprimida a fonte de carbono. O pH do meio foi ajustado para 9 com 0,2 % de Na_2CO_3 . Em frascos Erlenmeyer de 50 mL, foram acondicionados 20 mL do meio de cultura e 2% do volume final dos óleos e gorduras citados acima. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, os meios foram inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana preprada de acordo com o item 3.2.2.1 e incubados em banho termostatzado a 30°C com agitação constante de 200 rpm. Em intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 horas, as amostras foram centrifugadas, e a atividade lipolítica foi determinada no líquido sobrenadante.

3.2.6.4.2 Carboidratos

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 20 mL de meio de cultura composto por: 4% de peptona, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de extrato de levedura, 0,02% de MgSO_4 , 0,1% de NaCl e 2% dos seguintes carboidratos: glicose, sacarose, frutose, lactose e amido. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C. Após a esterilização, o pH do meio foi ajustado para 9 adicionado-se 0,01% de Na_2CO_3 e inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana preparada de acordo com o item 3.2.2.1 e incubados em banho termostatzado a 30°C a 200 rpm. Em intervalos de 24, 48, 72, 96, e 124 horas, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 10°C por 15 minutos. A atividade enzimática foi determinada no líquido sobrenadante de acordo com o item 3.2.8.

3.2.6.5 Estudo da da fonte de nitrogênio na produção de lipase pela linhagem de *Alcaligenes sp.*

Em frascos Erlenmeyer de 50 mL foram acondicionados 20 mL de meio de cultura composto por: 0,1% de K_2HPO_4 , 0,1% NaCl, 0,02% de MgSO_4 e 2% de sacarose e 4% dos seguintes compostos: extrato de levedura, cloreto de

amônio, uréia, sulfato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, peptona. Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C e inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana e em seguida incubados em banho termostatzado a 30°C com agitação de 200 rpm. Em intervalos de 24, 48, 72, 96, 20 horas as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 10°C por 15 minutos. A atividade enzimática foi determinada no líquido sobrenadante.

3.2.7 Produção da Lipase Alcalina Bruta

Para a produção de lipase alcalina a linhagem nº 212 selecionada, foi cultivada em frascos Erlenmeyers de 50 mL, contendo 20 mL de meio de cultura preparado conforme o item 3.2.6.1.6. Os frascos foram esterilizados e inoculados com 0,5 mL de suspensão bacteriana preparadas de acordo com o item 3.2.2.1 e incubados por 72 horas a 30°C com agitação de 200 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm a 10°C por 10 minutos, o precipitado foi descartado, sendo a atividade lipolítica determinada no líquido sobrenadante de acordo com o item 3.2.8.

3.2.8 Determinação da atividade Lipolítica

Em Erlenmeyer de 125 mL foram misturados 4 mL de tampão Tris - HCl 0,2 M pH 9, 1 mL de CaCl₂ 110 mM e 5 mL da emulsão composta de: 75 mL de álcool polivinílico (PVA) 2% e 25 mL de óleo de oliva (v/v). Ao sistema de reação foi adicionado 1 mL de solução enzimática, sendo a mistura incubada em banho- maria termostatzado por 15 minutos a 130 oscilações por minuto.

Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M aquoso, utilizando-se azul de timol como indicador.

Uma unidade de lipase foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto nas condições descritas acima.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oléico x mL de NaOH 0,05M aquoso.

3.2.9 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Para um litro de extrato enzimático aquoso 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 4°C, para a total precipitação proteica.

A mistura proteica foi centrifugada a 7.000 rpm por 20 minutos a 10°C e dialisada contra água destilada por 24 horas a 4°C para a liberação do sal e em seguida dialisada contra tampão Tris-HCl 0,05M pH 9 por 24 horas a 4°C. Após a diálise foi determinada a atividade enzimática. A mistura obtida foi congelada e liofilizada. O material liofilizado foi triturado em almofariz, pulverizado e denominado preparação enzimática bruta. A concentração de proteínas totais presentes no extrato enzimático bruto foi determinada de acordo com o método de LOWRY (36).

3.2.10 Caracterização Bioquímica da Lipase Bruta

A lipase alcalina obtida de acordo com o item 3.2.9. foi utilizada para o estudo das características bioquímicas tais como: pH ótimo, pH de estabilidade, temperatura ótima, temperatura de estabilidade, especificidade de substrato.

3.2.10.1 Efeito do pH na atividade enzimática da lipase

Diversos tampões foram utilizados de acordo com a sua capacidade a tamponante, nos seguintes valores: tampão acetato 0,2M pH 3,6 a 5,6, tampão fosfato 0,2M pH 6,0 a 7,5, tampão Tris-HCl 0,2M pH 8 a 9 e tampão Glicina - NaOH 0,2M pH 9,5 a 10.

Em Erlenmeyer de 125 mL foram preparados sistemas de reação compostos de 5 mL de emulsão de álcool polivinílico 2% e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente, 2 mL de cada tampão descrito acima, 1 mL de CaCl_2 110 mM e 1 mL de solução enzimática bruta contendo 10 mg/mL. As misturas de reação foram incubadas a 40°C por 15 minutos com agitação de 130 oscilações por minuto. Após a incubação a determinação da atividade prosseguiu conforme descrito no item 3.2.8.

3.2.10.2 Efeito do pH na estabilidade da lipase

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade da lipase obtida foram tomados 2 mL de solução enzimática bruta contendo 10 mg/mL aos quais foram misturados 2 mL de tampão nos diferentes valores de pH, permanecendo por 24 horas à temperatura de 25°C.

Foram utilizados os seguintes sistemas tampões: tampão acetato de sódio pH de 3,6 a 5,6, tampão fosfato de sódio pH de 6,0 a 7,5, tampão Tris HCl pH 8 a 9, tampão Glicina NaOH pH de 9,5 a 10. Após a incubação, retirou-se alíquota de 1 mL e verificou-se a atividade lipolítica remanescente segundo o item 3.2.8.

3.2.10.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase de *Alcaligenes sp.*

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 3.2.8 utilizando as temperaturas de incubação de 25°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 70°C.

3.2.10.4 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

A solução de enzima na concentração de 10 mg/mL foi tratada a temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 70°C por uma hora. Após o tratamento térmico a atividade enzimática remanescente foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.5 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de oliva pela lipase

Para o estudo da relação entre o tempo de reação e a porcentagem de hidrólise, foram tomados 1 mL de solução da enzima contendo 10 mg/mL e adicionado ao sistema de reação composto de 5 mL de emulsão, 4 mL de tampão Tris- HCl pH 9 0,2M e 1mL de solução de CaCl₂ 110 mM.

A mistura foi incubada a 40°C em banho termostatizado com agitação de 130 oscilações/minuto nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 15 minutos, 2, 4, 24, 48, 72 e 96 horas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona/etanol (1:1 v/v) os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M, sendo calculada a porcentagem, de hidrólise considerando-se o n° de saponificação.

$$\% \text{ de Hidrólise} = \text{mL de NaOH } 0,05\text{M} / \text{n}^\circ \text{ de saponificação} \times 100$$

Foram retiradas amostras dos sistemas de reação para análise através de cromatografia em camada delgada (CCD).

3.2.10.6. Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise pela lipase alcalina de *Alcaligenes sp.* em diferentes substratos

Para o estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise foram utilizados os seguintes substratos: óleo de oliva, gordura de leite de cabra, óleo de mamona, gordura de porco.

Os sistemas de reação foram compostos de 25 mL dos substratos citados acima e adicionados a 75 mL de álcool polivinílico a 2% e homogeneizados por 3 minutos a 1000 rpm.

Em Erlenmeyer de 125 mL foram misturados 5 mL da emulsão preparada conforme descrito acima, 4 mL de tampão Tris-HCl 0,2M pH 9, 1 mL de CaCl₂ 110 mM e 1mL de preparação enzimática. A mistura foi incubada a 40°C em banho termostatizado nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 15 minutos, 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas. Nestes intervalos de tempo as reações foram paralisadas pela adição de 15 mL de solução de acetona -etanol (1:1 v/v) Os ácidos graxos

liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05 M aquosa, utilizando-se azul de timol como indicador.

3.2.10.6.1 Determinação do número de saponificação

A 5 mL de emulsão de álcool polivinílico 2% e óleo de oliva (75% : 25%) foram acrescentados 4 mL de tampão Tris- HCl 0,2M pH 9 e 25 mL de solução de KOH 5,6% alcoólica.

A mistura de reação foi aquecida à ebulição por 40 minutos e após esse período a solução de KOH remanescente foi titulada contra solução de HCl 0,05M utilizando-se fenolftaleína como indicador.

3.2.10.6.2 Cromatografia em camada delgada dos produtos da hidrólise enzimática.

A cromatografia em camada delgada foi realizada preparando-se placas de sílica 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 20x 20 com aplicador Desaga. O sistema de solventes (fase móvel) utilizado para a cromatografia foi composta por: éter de petróleo, éter etílico e 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 a 25°C. Foram utilizados como padrões trioleína, dioleína 1,2 (2,3), monoleína 1 (3) e ácido oléico na concentração de 1% em solução de acetona: etanol 1: 1 (v/v).

A revelação do cromatograma foi feita incubando-se a placa de cromatografia em câmara de Iodo sublimado, a 110 °C por 1 hora

3.2.10.7 Estudo do efeito de detergentes na atividade enzimática

Para o estudo do efeito de soluções detergentes na atividade da lipase da linhagem de *Alcaligenes sp* foram utilizadas as seguintes soluções: Triton X- 100 a 1%, Sódio Duodecil Sulfato (SDS) 1%, Polifosfato Tetrasódico (STPP) nas concentrações de: 0,1%, 0,5%, 1,0%.

Em Erlenmeyers de 125 mL foram adicionadas a mistura de reação preparada de acordo com o item 3.2.8, 1 mL das soluções detergentes para cada sistema de reação e 1mL de solução enzimática bruta. O sistema de reação foi incubado a 37°C em banho termostatzado com agitação de 130 oscilações por minuto, nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 15 minutos, 1, 6 e 24 horas de reação. A atividade remanescente da enzima foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.7.1 Estudo do efeito de detergentes na atividade enzimática da lipase de *Alcaligenes sp* e lipase comercial

Para o estudo do efeito de detergentes na atividade enzimática da lipase de *Alcaligenes sp* e lipase comercial, foram misturados em tubos de ensaio, 50 mg de detergente e 100 mg das respectivas enzimas em 10 mL de água destilada. Os tubos permaneceram a temperatura ambiente (25°C) tendo sido tirada 1 alíquota de 1 mL para medida de atividade remanescente nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas e 148 horas de incubação.

3.2.10.7.2 Estudo do efeito de protease na ação enzimática da lipase de *Alcaligenes sp* e lipase comercial

Em tubos de ensaio foram misturados 125 mg de protease bacteriana em 5 mL de água destilada, a esta solução foi adicionado 10 mg /mL das enzimas. Os tubos foram incubados a temperatura de 25°C, nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 24, 48 e 72 horas. Foi retirada uma alíquota de 1 mL e a atividade remanescente foi determinada de acordo com o item 3.2.8

3.2.10.7.3 Efeito da temperatura na atividade da lipase comercial e lipase de *Alcaligenes sp*.

A atividade enzimática das lipase de *Alcaligenes sp* e lipase comercial foi verificada em diferentes temperaturas de acordo com o item 3.2.8, utilizando-se as seguintes temperaturas de incubação: 12°C, 20°C, 35°C, 40°C, 45° e 50°C e 55°C.

3.2.10.7.4 Efeito do pH na atividade da lipase de *Alcaligenes sp* e Lipase comercial

Para o estudo do efeito do pH na atividade enzimática foi utilizado o sistema de reação descrito no item 3.2.10.1 A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.7.5 Estudo da ação hidrolítica das lipases de *Alcaligenes sp* e Lipase comercial em tecido de algodão impregnado com óleo de oliva.

Para o estudo da ação hidrolítica das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial foram preparados 4 sistemas de reação: sistema 1 contendo: 0,5% de detergente comercial e 20 mL de água destilada; sistema 2 contendo: 0,5% de detergente comercial, 0,2g de lipase 212 (*Alcaligenes sp*) e 20 mL de água destilada; sistema 3 contendo 0,5% de detergente comercial, 0,2 g de lipase comercial e 20 mL de água destilada, sistema 4 composto por 20 mL de água destilada. Nestes sistemas de reação foram colocados uma tira de tecido de algodão (de cor branca) de dimensão 3cm x 3cm impregnado com 2 mL de óleo de oliva. Os sistemas foram deixados em repouso por um período de aproximadamente 4 horas. Após esse intervalo, os tecidos foram retirados e secados à temperatura ambiente. Depois de secos, os tecidos foram impregnados com o corante Sudan IV, reagente lipossolúvel de coloração marron, que adquire coloração vermelha intensa em presença de lipídios. Os tecidos foram analisados quanto a intensidade de coloração desenvolvida após o tratamento do tecido com os diferentes sistemas de reação. A coloração vermelha intensa no tecido indicou a presença de lipídios não removidos pelo sistema de reação e a coloração marron foi indicativa da remoção de lipídios pelos componentes do sistema de reação.

3.2.10.8 Efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais e a atividade da lipase sobre o substrato óleo de oliva, foi verificado dentro da faixa de concentração de minerais onde não havia interferência do método na determinação da atividade enzimática. Para este estudo, o sistema de reação foi constituído de 4 mL de tampão Tris-HCl pH 9, 1mL de CaCl_2 110 mM, 5 mL de emulsão composta por 25 mL de óleo de oliva: 75 mL de

álcool polivinílico 2%, 1 mL de solução enzimática contendo 10 mg/mL e 1 mL de solução dos seguintes compostos: ZnSO_4 , MgSO_4 , AgNO_3 , FeSO_4 , KCl , MnSO_4 , Na_2SO_4 , CaCl_2 , nas concentrações necessárias para 1 mM e 10 mM em relação ao volume final do sistema de reação. A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.8.1 Estudo do efeito de CaCl_2 e MgSO_4 na atividade enzimática

Para este estudo, foram utilizados 4 sistemas de reação constituídos de 4 mL de tampão Tris - HCl 0,2 M pH 9, 5 mL de emulsão composta por 75 mL de álcool polivinílico 2% e 25 mL de óleo de oliva, 1 mL de solução enzimática contendo 10 mg/mL, ao sistema foi adicionado 1 mL de CaCl_2 110 mM em relação ao volume final do sistema de reação. No sistema 2 foi adicionado 1 mL de MgSO_4 na concentração de 10 mM em relação ao volume final do sistema de reação. No sistema 3 foi adicionado 1 mL de solução dos sais minerais MgSO_4 e CaCl_2 nas concentrações necessárias para 10 mM em relação ao volume final do sistema de reação. No sistema 4 não foi adicionado sais minerais, funcionando como sistema controle. Os frascos Erlenmeyer contendo os sistemas de reação foram incubados em banho termostatizado a 40°C com agitação de 130 oscilações por minuto e a intervalos de 15 minutos, 2, 4, 24, 48, 72 e 96 horas, as amostras foram retiradas e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.9 Efeito de inibidores na atividade enzimática de *Alcaligenes sp.*

O sistema de reação foi preparado de acordo com o item 3.2.8, sendo adicionado ao sistema 1 mL das seguintes soluções: p- cloromercuribenzoato, cisteína, iodoacetamida, bissulfito de sódio e β -mercaptoetanol na concentração

necessária para perfazer 1 mM em relação ao volume final da mistura de reação. A atividade residual foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.10.10 Estudo da ação hidrolítica da lipase alcalina quanto ao tipo de ácido graxo no triglicerídeo

Em Erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 2 mL de tampão Tris-HCl 0,2M pH 9, 0,5 mL de CaCl_2 110 mM, 0,5 mL de solução enzimática contendo 5mg/mL e 0,5 g de um dos seguintes substratos: tricaprilina, tributirina, trioleína, triestearina e tripalmitina (SIGMA). Os frascos foram incubados em banho termostatizado a 37°C por 72 horas, com agitação de 130 oscilações por minuto. Após a incubação a reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona/etanol (1:1v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M utilizando-se azul de timol como indicador.

3.2.11 Estudo da ação de esterificação da lipase de *Alcaligenes sp.*

Em bequer de 250 mL contendo 80g de glicerol e 10g de ácido oleico, foram acrescentados 100 mg de enzima bruta. O frasco foi incubado a 40°C em banho termostatizado com agitação de 500 rpm nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 1, 2, 4, 24, 48, e 72 horas de reação. A cada intervalo de tempo, 1 alíquota foi retirada e a reação paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona/etanol na proporção de (1:1v/v) e o ácido oléico remanescente foi titulado contra solução de KOH 0,05M, utilizando fenolftaleína como indicador. A porcentagem de esterificação foi calculada em relação ao teor de ácido oléico presente no tempo zero de reação e o teor de ácido oléico remanescente após o tempo de reação.

3.2.12 Purificação da lipase de *Alcaligenes sp.*

3.2.12.1 Fracionamento com Sulfato de Amônio

O fracionamento com sulfato de amônio foi realizado de acordo com o item 3.2.9.

3.2.12.2 Cromatografia de Troca Iônica em coluna de DEAE- Sephadex A-50

Cerca de 15 g de DEAE- Sephadex foi tratada com 500 mL de HCl 0,5 M e lavada com H₂O destilada para a remoção do HCl. Em seguida, a resina foi tratada com 500mL de NaOH 0,5 M, lavada com H₂O até completa remoção do NaOH, e finalmente equilibrada com tampão Tris- HCl 0,001M pH 8, 2,5 g de enzima bruta preparada de acordo com o item.3.2.9 foi diluída em 16 mL de H₂O destilada e em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos. O volume de 15 mL foi aplicado em coluna de DEAE - Sephadex G- 50 (2,5 cm x 40 cm),previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,001M pH 8. A enzima foi eluída da coluna pela aplicação de 300mL de tampão Tris-HCl 0,001 M contendo concentrações de NaCl variando de 0,1 a 0,5M consecutivamente. Frações de 10 mL foram coletadas a cada 30 minutos utilizando-se coletor de frações Buchler mod.Alpha 200. O curso de eluição das amostras 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 85 a 100 contendo atividade lipolítica foram reunidas num total de 150 mL e denominada fração I, seguindo o curso de eluição de proteínas um outro grupo de frações de n°s 182 a 198 contendo atividade lipolítica foram reunidas em um total de 160 mL e denominada fração II. Estas frações foram dializadas contra H₂O destilada por 24 horas a 10°C e em

seguida dializadas contra solução de tampão Tris- HCl 0,001M pH 8 e posteriormente foram concentradas utilizando-se ultrafiltração em membrana de porosidade de 10 kDalton. A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.13 Caracterização bioquímica da lipase purificada de *Alcaligenes sp.*

3.2.13.1 Efeito do pH

3.2.13.1.1 Determinação do pH ótimo de atividade

Em Erlenmeyer de 125 mL foram preparados sistema de reação compostos de 5 mL de emulsão de álcool polivinílico 2% e óleo de oliva na proporção de 75%:25% respectivamente, 4 mL de cada solução tampão preparada de acordo conforme descrito no item 3.2.10.1, 1 mL de CaCl_2 110 mM e 1 mL de solução enzimática (fração I contendo 1,25 unidades/mL e fração II contendo 1,9 unidades/mL). A atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.13.1.2 Determinação do pH de estabilidade

Dois mL de solução enzimática (fração I contendo 1,25 unidades/mL e fração II contendo 1,9 unidades/mL) foram misturados com 2 mL de cada solução tampão descrita no item 3.2.10.1 por 24 horas à temperatura de 25°C. Após o tratamento, 1 mL da solução enzimática foi acrescentada nos frascos e a atividade remanescente foi verificada de acordo com o item 3.2.8

3.2.13.2 Efeito da Temperatura

3.2.13.2.1 Determinação da temperatura ótima de atividade enzimática

A atividade enzimática da lipase purificada, foi testada em diferentes temperaturas de acordo com o item 3.2.8, utilizando-se as seguintes temperaturas de incubação: 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C e 65°C.

3.2.13.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da enzima

Dois mL da solução enzimática (fração I contendo 1,25 unidades /mL e fração II contendo 1,9 unidades/mL) foram tratados a temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C por uma hora. Após o tratamento térmico a atividade enzimática remanescente foi determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.13.3 Efeito de sais minerais na atividade da lipase purificada

O efeito de sais minerais na atividade enzimática sobre o substrato óleo de oliva emulsificado com álcool polivinílico, foi verificado 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 conforme descrito no item 3.2.8 acrescido de 1 mL das seguintes soluções perfazendo na concentração final da mistura 10 mM e 1 mM: MgSO₄, MnSO₄, AgNO₃, KCl, FeSO₄, Na₂SO₄, CaCl₂ e ZnSO₄. As misturas foram incubadas a 40°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona/ etanol 1:1 (v/v), os ácidos graxos livres liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M utilizando azul de timol como indicador.

3.2.13.4 Efeito de inibidores na atividade da lipase purificada de *Alcaligenes sp.*

O sistema de reação foi constituído como descrito no item 3.2.8., acrescido de 1 mL das seguintes soluções: paracloromercuriobenzoato, cisteína, iodoacetamida, bissulfito de sódio e β -mercaptoetanol na concentração necessária para perfazer 1 mM em relação ao volume final total da mistura de reação e 1 mL de solução enzimática purificada (fração contendo 1,25 unidades/ml e fração II 1,9 unidades/ml). As misturas foram incubadas a 40°C por 30 minutos em banho termostatzado com agitação de 130 oscilações por minuto.

A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de solução de acetona: etanol (1:1 v/v) e os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de NaOH 0,05M utilizando-se azul de timol como indicador.

3.2.13.5 Hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase purificada

Para o estudo da hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase purificada, foi adicionado 1 mL de solução enzimática purificada ao sistema de reação composto de 5 ml de emulsão de álcool polivinílico e óleo de oliva na proporção de 75%: 25% respectivamente, 4 mL de tampão Tris - HCl 0,2M pH 9 e 1 mL de solução de CaCl_2 110 mM.

A mistura foi incubada a 40°C em banho termostatzado com agitação de 130 oscilações por minuto, nos seguintes intervalos de tempo: tempo zero, 15 minutos, 2, 6, 24, 48, 72 e 96 horas. Após cada período, as amostras foram retiradas e a atividade enzimática determinada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.13.6 Determinação do teor de açúcares totais da lipase purificada

O conteúdo de açúcares totais presente na lipase purificada de *Alcaligenes sp.* foi determinado pelo método de DUBOIS *et alii* (9).

3.2.13.7 Determinação do Peso Molecular das frações I e II da lipase purificada por eletroforese em gel SDS- PAGE

O peso molecular aparente das frações I e II da lipase purificada de *Alcaligenes sp* foi verificado utilizando eletroforese em gel de SDS PAGE de acordo com o método de LAEMMLI (31) e coloração em prata de acordo com o método de OAKLEY *et alii* (48).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção Preliminar de Microrganismos

Após o isolamento de aproximadamente 550 linhagens de microrganismos de amostras de solo, resíduos industriais e frutas, foram selecionadas 5 linhagens de bactérias, as quais apresentaram alta atividade lipolítica com relação ao teste descrito no item. 3.2.1. A tabela 1 indica as atividades lipolíticas das linhagens pré selecionadas. As linhagens pré selecionadas produziram lipase extracelularmente.

Tabela 1. Atividade lipolítica alcalina dos microrganismos selecionados.

n° linhagem	Atividade (μ moles/ min/mL)
198	5,77
212	9,21
242	6,24
414	4,12
511	8,5

4.1.2 Seleção do microrganismo melhor produtor de lipase alcalina

A linhagem de n°212 foi selecionada como a melhor produtora de lipase alcalina, dentre 5 linhagens preliminarmente selecionadas, por apresentar maior atividade de lipase na presença do substrato trioleína.

Para a seleção dos microrganismos, utilizou-se fermentação líquida de acordo com o método descrito no item 3.2.2.2, seguido de separação dos extratos brutos enzimáticos. Os extratos brutos extraídos foram analisados quanto a atividade

lipolítica através de titulação dos ácidos graxos liberados nas reações de hidrólise do substrato óleo de oliva.

4.2 Estudo do sistema de reação para a determinação da atividade lipolítica

Dentre os métodos testados para a determinação da atividade lipolítica, foi verificado que o emprego de álcool polivinílico como emulsificante, mostrou ser o mais adequado para a medida de atividade lipolítica para a lipase da linhagem de nº212, *Alcaligenes sp.* A tabela 2 traz os resultados obtidos neste experimento.

Tabela 2. Atividade lipolítica nos diferentes sistemas de reações.

Método	Substrato	Atividade (µmoles ácido graxo/min/mL)
3.2.5.1	Tampão Tris - HCl 0,2 M pH 9 Emulsão com goma arábica e óleo de oliva	7,0
3.2.5.2	Tampão Tris-HCl 0,2 M pH 9 Emulsão com desoxicolato de sódio e óleo de oliva	2,0
3.2.5.3	Tampão Tris- HCl 0,2M pH 9 e óleo de oliva	5,4
3.2.5.4	Tampão Tris- HCl 0,2M pH 9 e emulsão com álcool polivinílico	8,5

LINFIELD *et alii* (35), estudando a interação lipídio - lipólise, desenvolveram um método simplificado para medir a atividade lipolítica. Os autores concluem o experimento, observando que para se obter dados confiáveis na medida da atividade é necessário uma emulsificação prévia.

4.3 Identificação da linhagem produtora de lipase alcalina

A linhagem de nº212 melhor produtora de lipase alcalina, foi identificada como *Alcaligenes sp.*, de acordo com as características morfofisiológicas e bioquímicas descritas no “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” vol 1 (30).

A figura 1 mostra a fotografia do microrganismo.

A tabela 3 mostra as características morfológicas e bioquímicas da linhagem selecionada.

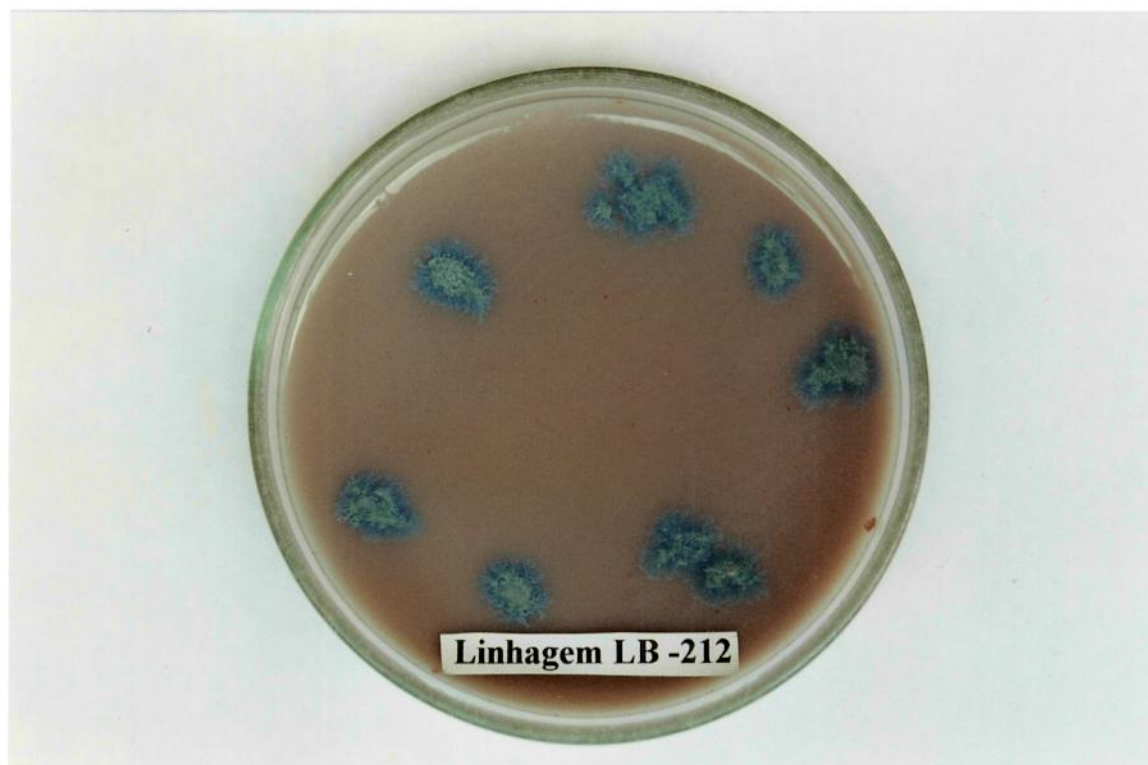


Figura 1. Fotografia do microrganismo produtor de lipase alcalina.

Tabela 3. Características morfológicas e bioquímicas da linhagem de *Alcaligenes sp.*

Características morfológicas

forma	bastonete
gram	--
formação de esporo	—
motilidade	+

Características Bioquímicas

Anaeróbio/ Aeróbio	Aeróbio
Temperatura de crescimento	10 a 40°C
pH para crescimento	6- 10
Catalase	+
Gelatinase	--
VP/VM	--
Indol	—
Oxidase	+
Redução de nitrato à nitrito	—
NaCl	0,1 a 4%
Urease	--
Fenilalanina	—
Citrato	+
OF	inerte
Litmus milk	não peptonizado
TSI ágar	—
Arginina	—
Fermentação de açúcares, produção de ácido/gás :	
sacarose, lactose, arabinose, maltose, manitol,	negativo
sorbitol, frutose, xylose, glicose	

4.4 Estudos dos parâmetros para a produção da enzima pela linhagem 212, selecionada como melhor produtora de lipase alcalina

4.4.1 Seleção do meio de cultivo para a produção da lipase por *Alcaligenes sp.*

Os resultados do melhor meio de cultivo para a produção de lipase por *Alcaligenes sp.* estão dispostos na figura 2. O meio de cultivo onde se obteve maior produção de lipase foi o meio 6 composto de: 2% de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, 1% de água de maceração de milho e 0,5% de K_2HPO_4 .

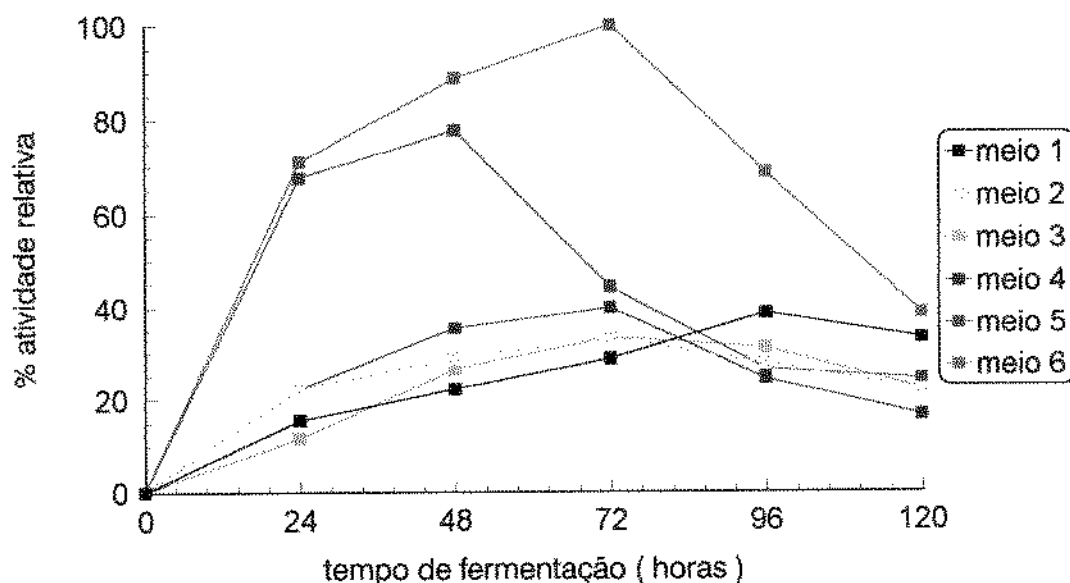


Figura 2. Efeito da melhor composição do meio de cultivo para a produção da lipase alcalina.

Observa-se que os meios 2 e 3 continham farinha de trigo como única fonte de carbono. Os meios 4 e 5 continham óleo de oliva como fonte de carbono, tendo uma fonte inorgânica como fonte de nitrogênio. O meio de cultura 5 continha em

sua composição 1% de farinha de trigo e óleo de oliva como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio.

ESPINOSA *et alii* (12), estudaram alguns efeitos nutricionais que afetam a produção de lipase por *Rhizopus delemar* CDBB H-313. Foi verificado que dextrina foi a melhor fonte de carbono, quando utilizada na concentração de 1% e extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio. Quando 2% de óleo de oliva foi adicionado ao meio de cultivo, um aumento de 84% na atividade lipolítica foi observado.

CHEN *et alii* (6), relataram as condições de cultivo para a produção de lipase por *Trichoporum fermentans*. Os autores verificaram uma produção de lipase significativa, quando o microrganismo foi cultivado a 30°C em meio de cultivo contendo 3% de óleo de oliva e 8% de água de maceração de milho como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente.

ALFORD & ELLIOT (1), reportaram estudos referentes aos efeitos e as condições nutricionais que afetam a produção e a atividade lipolítica por *Pseudomonas fluorescens*. Quando gordura de manteiga e peptona na concentração de 1% foi utilizada como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente houve um aumento da produção de lipase.

4.4.2 Estudo da relação entre temperatura, tempo de incubação e produção da lipase.

Para o estudo da temperatura ótima e o tempo de incubação para a produção de lipase alcalina, foi utilizada a fermentação líquida, com o meio de cultura nº6, preparado de acordo com o item 3.2.6.1.6. A atividade lipolítica foi determinada no sobrenadante nos intervalos de tempo de 24, 48, 72, 96, 120 horas nas temperaturas de 25°C, 30°C, 35°C, 40°C. Foi verificado neste experimento que a produção

máxima de lipase ocorreu à temperatura de 30°C em 72 horas de incubação. As figuras 3 e 4 ilustram os resultados obtidos.

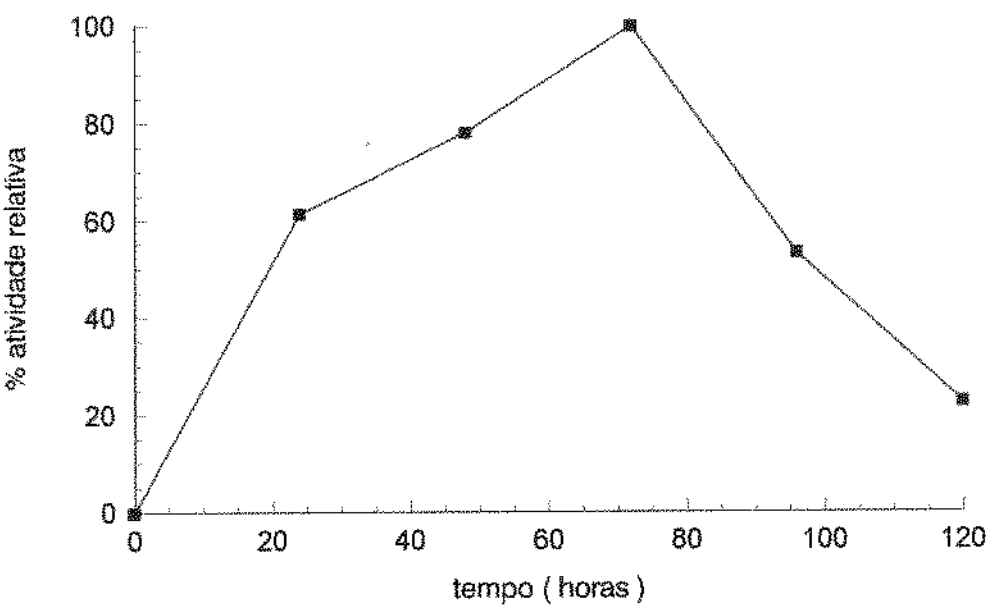


Figura 3. Efeito do tempo de fermentação na produção da lipase alcalina.

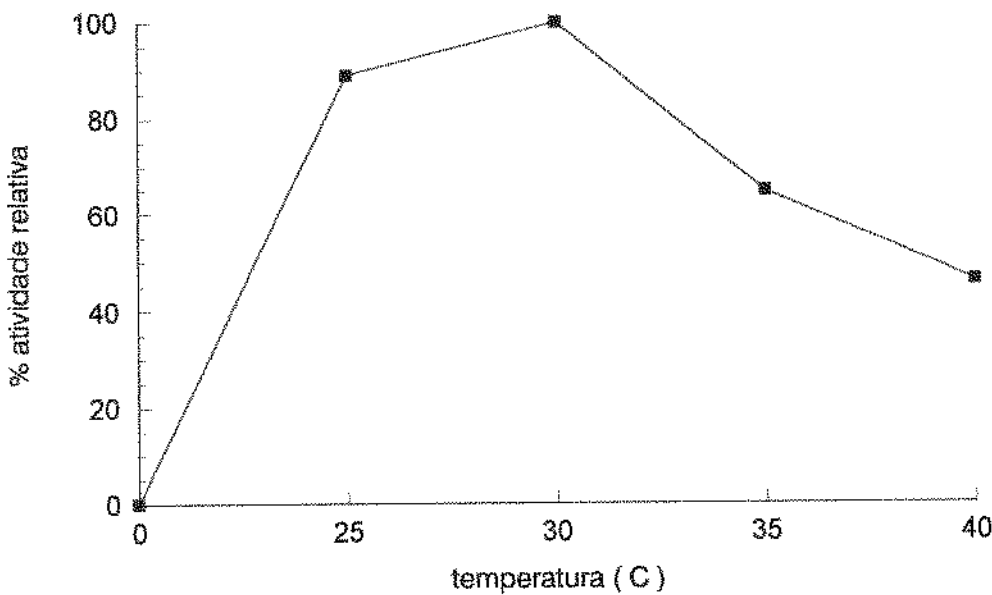


Figura 4. Efeito da temperatura na produção da lipase alcalina.

NASHIF & NELSON (45), estudaram as condições de cultivo para a produção de lipase por *Pseudomonas fragi*. Os autores verificaram que a produção

de lipase, ocorreu após 72 horas de incubação à temperatura de 15°C, não sendo detectada atividade lipolítica a 30°C.

ALFORD & ELLIOT (1), estudaram as condições de cultivo e produção de lipase por *Pseudomonas fluorescens*. A máxima produção de lipase, ocorreu em meio de cultivo contendo 1% de peptona à temperatura de 40°C em pH 7 por 72 horas.

JONSSON & SNYGG (24), estudaram as condições de cultivo de 4 linhagens microbianas. A atividade lipolítica presente no líquido sobrenadante das culturas de *Sacharomyccopsis lipolytica*, *Micrococcus caseolyticus*, *Bacillus licheniformes* e *Staphylococcus sp*, foram determinadas. Os autores verificaram que o pH e a temperatura ótima para a produção de *Micrococcus caseolyticus* foram de 9,5 e 45°C respectivamente. A lipase de *Bacillus licheniformes* produziu máxima atividade a 45°C em pH 8,5. As lipases de *Sacharomyccopsis lipolytica* e *Staphylococcus sp* produziram máxima atividade lipolítica à temperatura de 35°C e 30°C e pH de 8,5 e 9,5 respectivamente.

4.4.3 Estudo do efeito de ácidos graxos na produção da lipase alcalina

Para este estudo, foi utilizado o meio de cultura nº6, preparado de acordo com o item 3.2.6.1.6, ao qual foi adicionado 1% do volume final dos seguintes ácidos graxos: palmítico, esteárico, láurico, e ácido oléico. Os frascos foram inoculados e incubados em banho termostatizado com agitação rotatória de 200 rpm por 72 horas. Após esse período, o conteúdo dos frascos foram centrifugados e a atividade lipolítica determinada de acordo com o item 3.2.8. Verificou-se que os ácidos de cadeia longa e média saturada como os ácidos palmítico, esteárico e láurico, inibiram a produção da lipase de *Alcaligenes sp*.

Um ligeiro aumento da produção de lipase foi observado quando se utilizou ácido oléico no meio de cultivo após 48 horas de reação, no entanto, como pode ser

observado, a diferença de atividade entre o meio contendo ácido oléico e o meio sem ácidos graxos é muito pequena. A figura 5 demonstra os resultados obtidos.

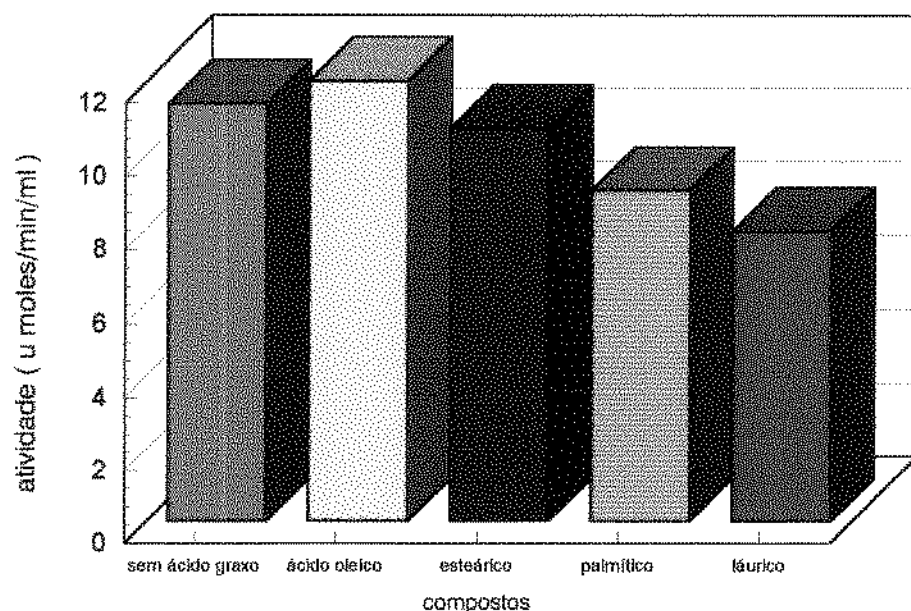


Figura 5. Efeito de ácidos graxos na produção de lipase alcalina.

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por SHIMADA *et alii* (64), no estudo realizado com *Geotrichum candidum*, no qual verificaram o aumento da produção de lipase em presença de ácidos graxos de cadeia longa como ácido oléico e inibição da produção na presença de ácidos graxos de cadeia média e saturada como o ácido láurico.

TSUJISAKA *et alii* (74), relataram estudos referentes a indução da formação de lipase de *Geotrichum candidum* Link. Foi verificado que substratos como óleo de oliva na concentração de 3% aumentaram a atividade lipolítica. Os ácidos graxos de cadeia longa, insaturada e ésteres como os ácidos linoléico, oléico e Span 60 (sorbitan monoestearato) na concentração de 1% tiveram um efeito indutor para a produção de lipase por *Geotrichum candidum* Link.

4.4.4 Estudo da fonte de carbono na produção de lipase alcalina

4.4.4.1 Triglicerídeos

A produção de lipase pela linhagem de *Alcaligenes sp.* foi testada em meio líquido, composto de: 4% de peptona, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de NaCl, 0,02% de $MgSO_4$, 0,01% de Na_2CO_3 e 2% de diferentes triglicerídeos utilizados como principal fonte de carbono. A figura 6 ilustra os resultados obtidos.

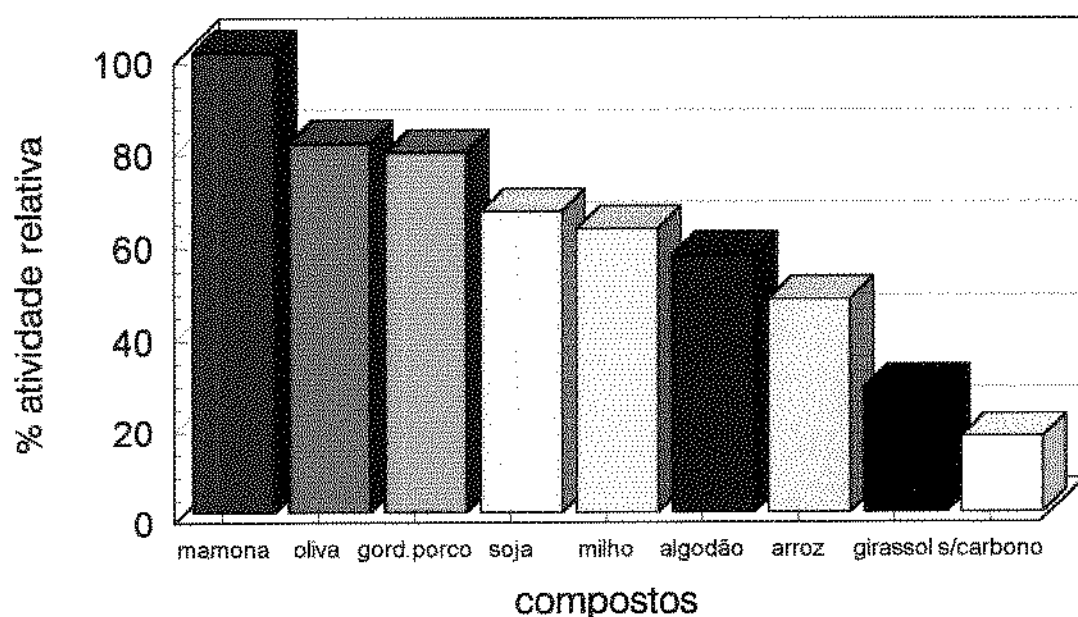


Figura 6. Efeito da fonte de carbono na produção de lipase: triglicerídeos.

A produção de lipase por *Alcaligenes sp.* foi fortemente induzida quando o óleo de mamona foi utilizado no meio de cultivo. O óleo de oliva e gordura de porco também induziram a produção de lipase. Observou-se neste experimento, um aumento da produção de lipase por *Alcaligenes sp.*, quando se utilizou triglicerídeos compostos em sua maioria por ácidos graxos de cadeia longa com uma única insaturação com o ácido oléico presente em maior proporção no óleo de oliva e o ácido ricinoléico, presente no óleo de mamona. Gordura de porco, constituída em sua maior fração por ácidos graxos de cadeia saturada também

influenciou a produção de lipase. Os óleos de soja, milho, algodão, arroz e girassol ricos em ácidos insaturados como os ácidos linoléico e linolênico, foram pouco efetivos na produção de lipase por *Alcaligenes sp.*

Em contrapartida, YAMAMOTO *et alii* (81), reportaram as condições de cultivo para a produção de lipase por *Pseudomonas sp.* Neste estudo, foi utilizado meio de cultivo composto por: 4% de peptona, 0,2% de K_2HPO_4 , 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de NaCl, 0,02% de $MgSO_4$, sendo adicionado ao meio 2% de diferentes óleos e gorduras dentre eles, os óleos de mamona e oliva. Verificou-se neste estudo, um aumento da produção de lipase quando o óleo de oliva foi utilizado como única fonte de carbono, embora também houvesse um ligeiro aumento na produção de lipase, quando se utilizou o óleo de mamona.

A produção de lipase por *Penicillium roquefort* (11), foi inibida na presença de gordura, óleo de milho ou óleo de oliva no meio de cultivo.

A linhagem de *Geotrichum candidum* Link, estudada por TSUJISAKA *et alii* (74), teve como característica principal, a produção de lipase, somente na presença de triglicerídeos e ácidos graxos no meio de cultivo. Dos resultados obtidos nesse estudo, foi verificado que a presença de óleo de oliva na concentração de 3% teve um efeito ativador na produção de lipase.

4.4.4.2 Carboidratos

Para este estudo, foi utilizado meio de cultivo composto de: 4% de peptona, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,05% de extrato de levedura, 0,02% de $MgSO_4$, 0,1% de NaCl e 2% dos seguintes carboidratos: glicose, sacarose, frutose, lactose e amido.

A máxima produção de lipase por *Alcaligenes sp.*, foi obtida, quando se utilizou 2% de sacarose no meio de cultivo, como única fonte de carbono em 48 horas de incubação, à temperatura de 30°C. A figura 7, ilustra os resultados obtidos.

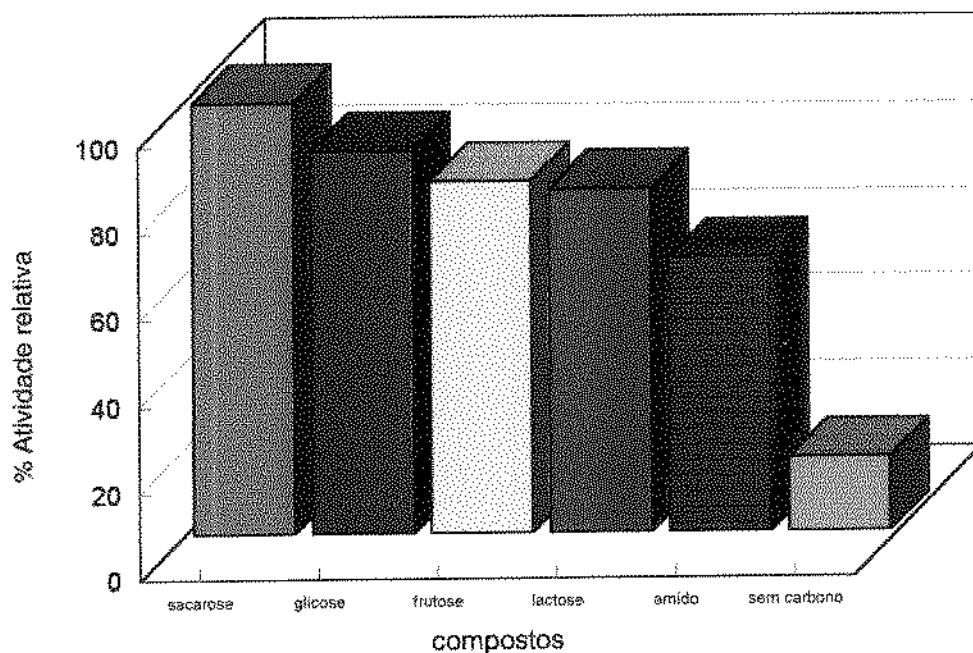


Figura 7. Efeito da fonte de carbono na produção de lipase: carboidratos.

NAIR & BONE (43), reportaram as condições de cultivo para a produção de *Aspergillus foetidus* em meio líquido. Foi encontrado que o óleo de oliva na concentração de 2% e sacarose 0,5% no meio de cultura, aumentaram a produção de lipase.

OHNISHI *et alii* (49), estudaram a produção de lipase por *Aspergillus oryzae*. A produção de lipase foi aumentada quando utilizou-se meio de cultivo composto por: 1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose como fonte principal de carbono.

PAL *et alii* (55), relataram as condições ótimas de cultivo e influência de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, microelementos e vitaminas na produção de lipases em culturas submersas de *Apergillus niger*. Os autores verificaram que sacarose na concentração de 1% foi a melhor fonte de carbono para a produção da lipase.

4.4.5 Estudo da da fonte de nitrogênio na produção da lipase

A máxima produção de lipase por *Alcaligenes sp.* foi obtida quando se utilizou sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio, em meio composto por: 2% de sacarose, 0,1% de K_2HPO_4 , 0,02% de $MgSO_4$, 0,1% de $NaCl$ e 0,01% de Na_2CO_3 em 48 horas de incubação a 30°C. A figura 8 mostra os resultados obtidos.

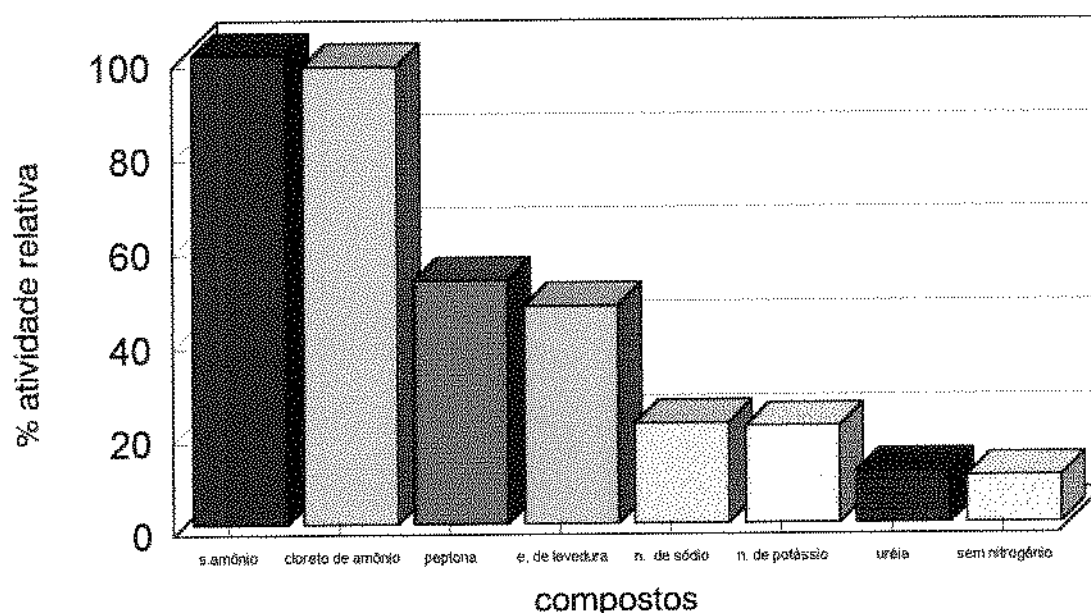


Figura 8. Efeito da fonte de nitrogênio na produção da lipase de alcalina.

NASHIF & NELSON (45), verificaram um aumento na produção de lipase por *Pseudomonas fragi*, quando glicose ou lactato foram utilizados como fonte de carbono e sulfato de amônio como única fonte de nitrogênio.

Por outro lado, ALFORD & PIERCE (2), verificaram um efeito inibidor na produção de lipase, quando se utilizou meio de cultivo contendo sulfato de amônio e glicose como fonte de nitrogênio e carbono respectivamente.

CUTCHINS *et alii* (8), estudaram o efeito das condições de cultivo na produção de lipase por *Alcaligenes viscosum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aeruginosa* ISC2F4. Nesse estudo, os autores verificaram que fontes

de nitrogênio orgânico como peptona e extrato de malte, tiveram um efeito ativador na produção de lipase para todas as linhagens estudadas.

4.5 Caracterização bioquímica da lipase bruta produzida por *Alcaligenes sp.*

4.5.1 Estudo do efeito do pH na atividade enzimática da lipase

O efeito do pH na atividade enzimática da lipase bruta de *Alcaligenes sp.* foi determinada de acordo com o item 3.2.10.1. A figura 9 mostra que o pH onde se obteve a atividade máxima da lipase de *Alcaligenes sp* foi 9 com tampão Tris- HCl 0,2M à temperatura de 40°C.

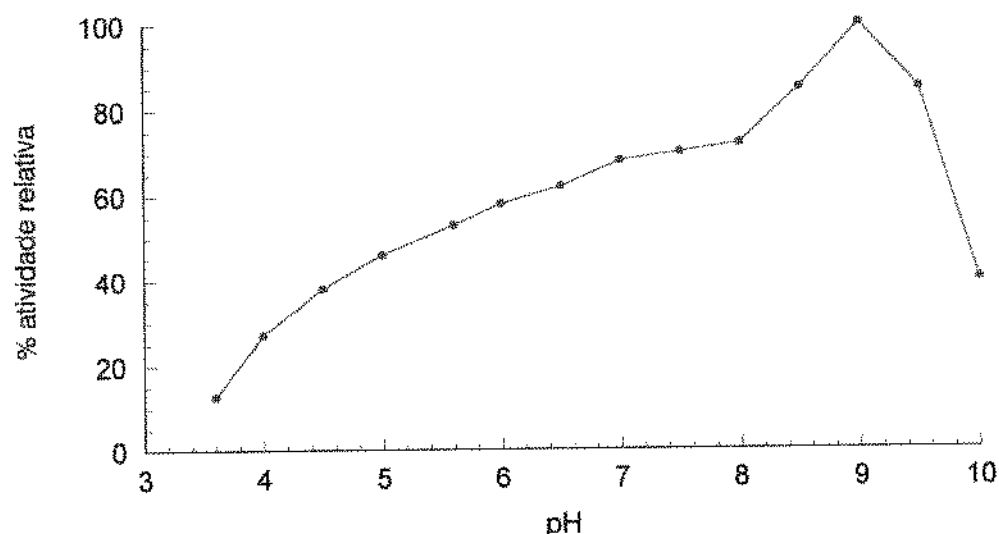


Figura 9. Efeito do pH na atividade da lipase alcalina.

Esta característica de atuar no pH alcalino abre possibilidade em potencial para a aplicação desta enzima em sistemas detergentes. KOKUSHO *et alii* (29), também isolaram e selecionaram linhagens bacterianas levando em conta o seu pH ótimo na região alcalina.

As lipases de *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas nitroreducens*, estudadas por WATANABE *et alii* (78), apresentaram pH na faixa entre 9,5 e 10.

A lipase de *Candida* BG-5, estudada por BHUSHAN & HOODAL (4) apresentou pH ótimo de 8,5.

Por outro lado, a lipase de *Chromobacterium* isolada por YAMAGUCHI *et alii* (79), demonstraram pH ótimo de atividade na faixa entre 7 e 8, sendo ainda bastante ativa no lado ácido do pH.

4.5.2 Estudo do efeito do pH na estabilidade da lipase

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.10.2. A lipase de *Alcaligenes sp.* apresentou estabilidade na faixa de 7,5 a 8,5 a 30°C em tampão Tris- HCL 0,2M, perdendo 67,3% da atividade quando tratada com tampão Glicina- NaOH 0,2M pH 10, após 24 horas de incubação. A figura 10 mostra os resultados obtidos.

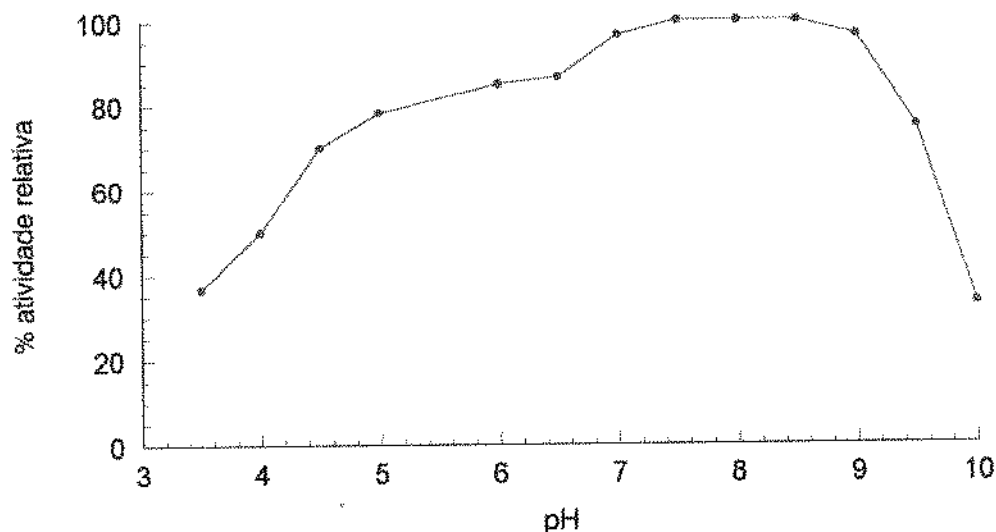


Figura 10. Efeito do pH na estabilidade da lipase alcalina.

Estes resultados divergem dos encontrados por WATANABE *et alii* (78) em estudos realizados com as lipases alcalinas das linhagens de *Pseudomonas*

nitroreducens e *Pseudomonas fragi*, que apresentaram uma estabilidade de pH na faixa de 5 a 11, após 24 horas de incubação a 5°C.

CHANDER *et alii* (5), verificaram que a lipase produzida por *Streptococcus faecalis* mostrou-se estável na faixa de pH entre 6 e 8.

PAPON & TALON (57), verificaram que o pH de estabilidade para a lipase de *Lactobacillus curvatus*, esteve na faixa de 4 a 11 e a lipase de *Brochotrix thermosphacta* apresentou pH de estabilidade na faixa de 5 a 9.

4.5.3 Estudo do efeito da temperatura na atividade da lipase

O efeito da temperatura na atividade da lipase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.3. A lipase produzida pela linhagem de *Alcaligenes sp.*, apresentou temperatura ótima de 45°C em tampão Tris- HCl 0,2M pH 9 como demonstra a figura 11.

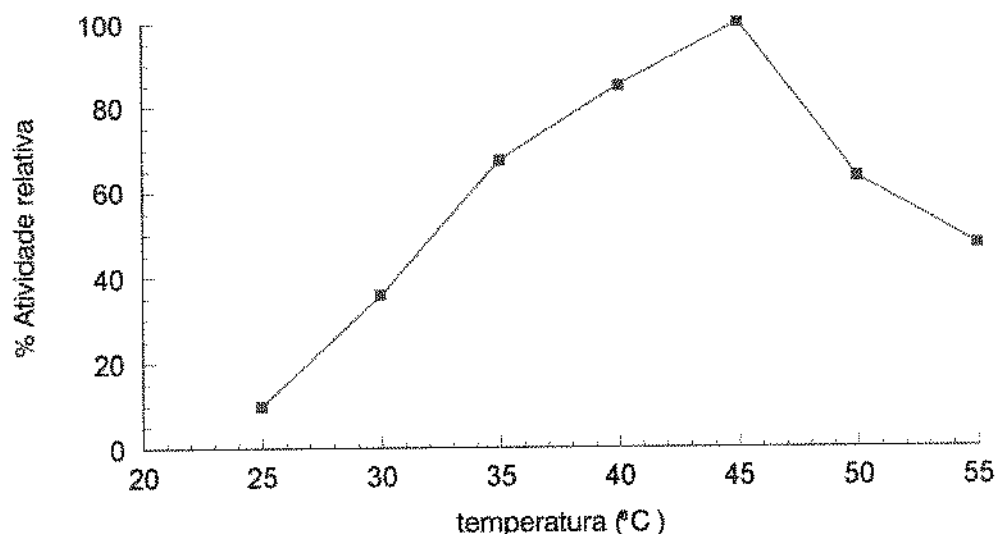


Figura 11. Efeito da temperatura na atividade da lipase alcalina.

Estes resultados diferem dos encontrados pelas enzimas estudadas por WATANABE *et alii* (78), a lipase de *Pseudomonas nitroreducens*, apresentou temperatura ótima de 50°C e de 75°C a 80°C para a lipase de *Pseudomonas fragi*.

DUPUIS *et alii* (10), estudando as propriedades de bactérias do gênero *Propionibacterium*, verificaram que a máxima atividade lipolítica foi expressa a 45°C em pH 6,8.

A temperatura ótima de atividade encontrada para a lipase alcalofílica da linhagem de *Candida* BG-50 (4) foi de 40°C.

4.5.4 Estudo do efeito da temperatura na estabilidade da lipase

O estudo referente ao efeito da temperatura na estabilidade da lipase de *Alcaligenes sp.*, foi realizado de acordo com o as condições descritas no item 3.2.10.4. A figura 12 ilustra os resultados obtidos.

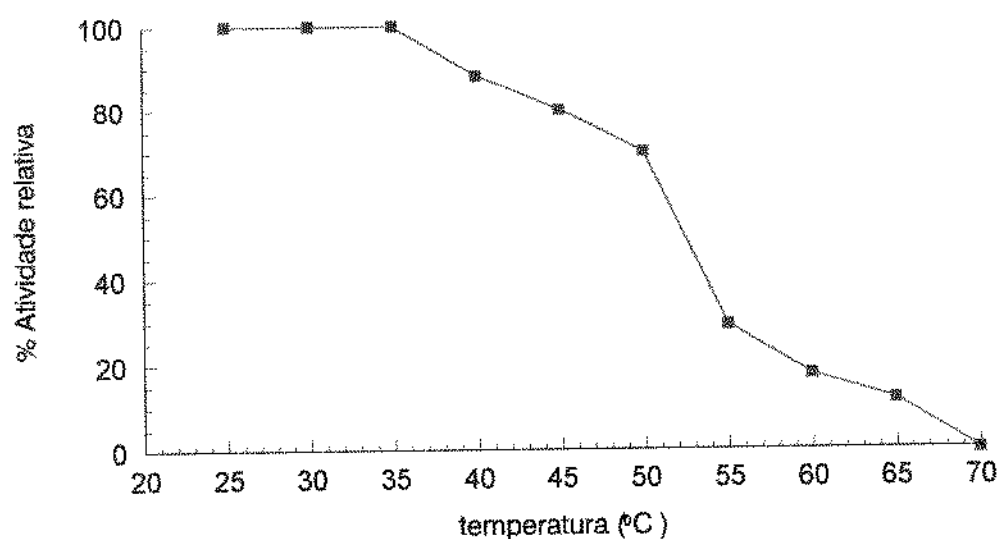


Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade da lipase alcalina.

A enzima mostrou-se estável nas temperaturas, entre 25°C e 35°C, retendo 80% da atividade lipolítica, quando incubada por 1 hora a 45°C e completamente inativada a 70°C, sendo portanto, termolábil.

A lipase de *Pseudomonas fragi* estudada por LU & LISKÁ (37), apresentou termoresistência, pois perdeu apenas 27,1% de atividade após aquecimento a 62°C por 1 hora, sendo porém completamente inativada quando submetida a 66°C por 1 hora ou a 71°C por 10 minutos.

YAMAGUCHI *et alii* (79), verificaram que a lipase de *Chromobacterium*, apresentou termoestabilidade até 60°C, no entanto a enzima perdeu 15, 39, 93 e 97 % de atividade quando aquecida por 10 minutos a 70°C, 80°C, 90°C e 100°C respectivamente.

4.5.5 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de oliva pela lipase alcalina

O estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de óleo de oliva foi acompanhado incubando-se o sistema de reação descrito no item 3.2.10.5, por períodos de tempo de 15 minutos, 2, 4, 24, 48, 72 e 96 horas de reação. As figuras 13A e 13B demonstram os resultados obtidos.

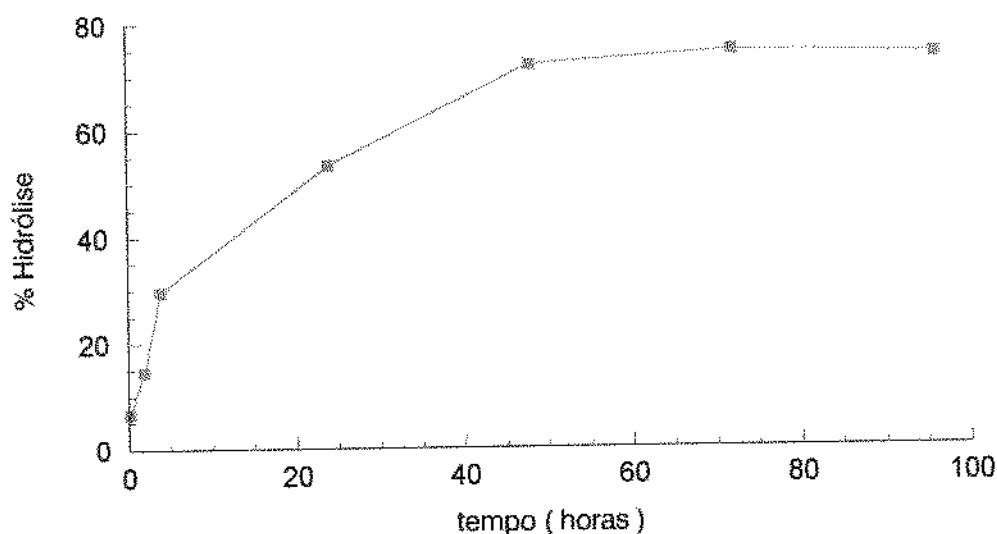


Figura 13A. Curva de hidrólise do óleo de oliva em função do tempo.

Foi verificado que no período de 24 horas de reação a porcentagem de hidrólise da lipase de *Alcaligenes sp.* foi de 53,3% e a 72 horas esta porcentagem aumentou para 74,5% de hidrólise em pH 9. A figura 13B mostra a cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise em óleo de oliva pela lipase de *Alcaligenes sp.*

Pode-se verificar pelo cromatograma que a lipase de *Alcaligenes sp* hidrolisou o substrato óleo de oliva e liberando (1) monoleína, (2,3) dioleína e ácido oleico, podendo ser classificada como lipase 1,3 específica.

LINFIELD *et alii* (34), estudaram a hidrólise de banha, óleo de côco e óleo de oliva pelas lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrizus*. Os autores verificaram que a taxa de hidrólise de óleo de oliva, foi superior, comparadas com a lipólise de banha e óleo de côco. As lipases de *Aspergillus niger* e de *Candida rugosa*, hidrolisou os substratos completamente em 72 horas de reação. Ambas lipases não foram específicas, atacando as posições 1,2 do triglicerídeo.

SUGIHARA *et alii* (67), verificaram que a lipase de *Bacillus sp*, hidrolisou preferencialmente as posições 1,3 quando se utilizou óleo de oliva como substrato.

OKUMURA *et alii* (52), verificaram que as lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* hidrolisaram trioleína e produziram 1,2 (1,3) dioleína e 2 monoleína e ácido graxo. As lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* atacaram as cadeias do triglicerídeo independente de posição.

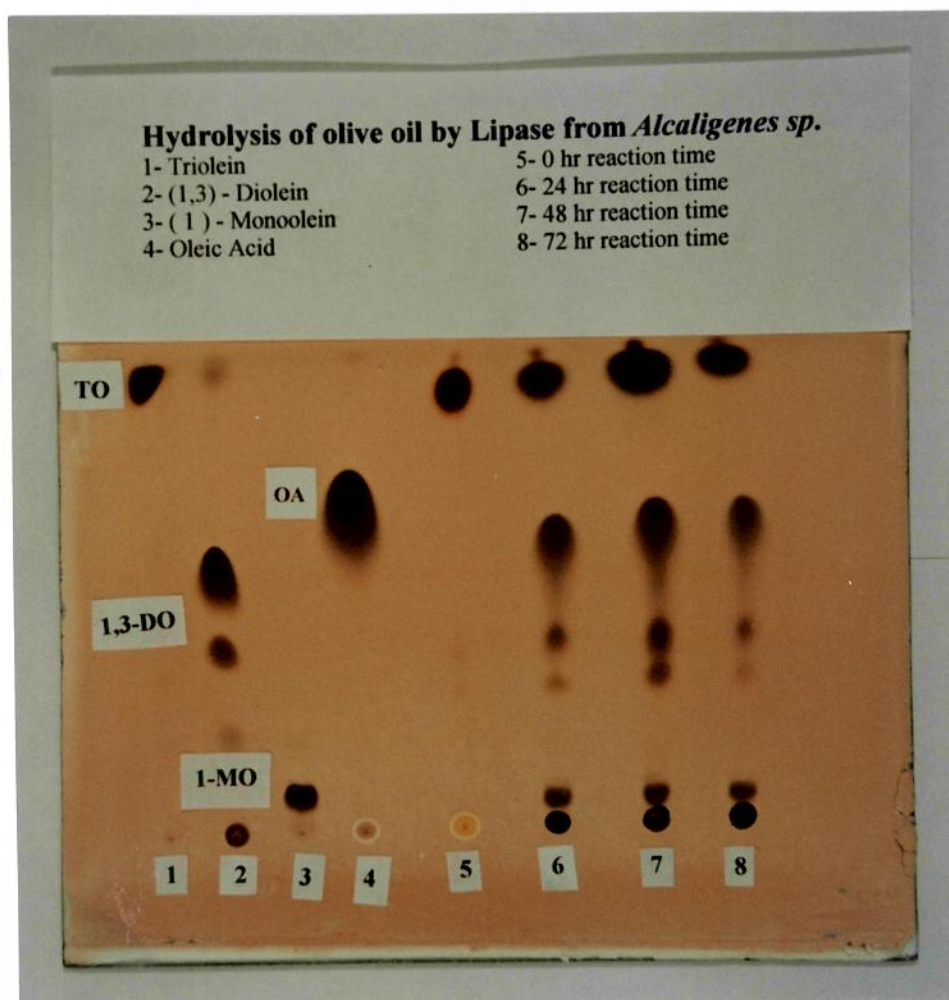


Figura 13B. Cromatografia dos produtos de hidrólise em óleo de oliva pela lipase bruta de *Alcaligenes sp.*

4.5.6 Estudos do tempo de reação e porcentagem de hidrólise de diferentes substratos pela lipase alcalina

Para o estudo da relação entre tempo de reação e porcentagem de hidrólise foram utilizados os substratos: óleo de oliva, gordura de leite de cabra, óleo de mamona, gordura de porco. O efeito do tempo de reação na porcentagem de hidrólise dos substratos citados acima foi acompanhado incubando-se os sistemas de reação descritos no item 3.2.10.6, por períodos de 15 minutos, 1, 4, 24, 48, 72 e 96 horas de reação. As figuras 14 A e 14 B ilustram os resultados obtidos.

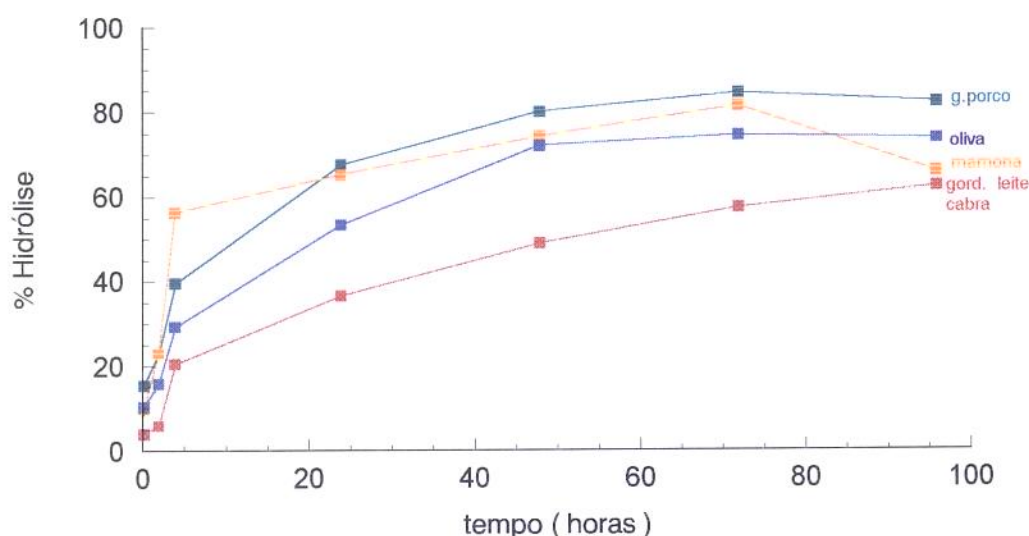


Figura 14A. Curva de hidrólise dos diferentes substratos em função do tempo.

A figura 14A demonstra que em 24 horas a porcentagem de hidrólise de gordura de porco é de 67,6% e 65,2% para óleo de mamona pela lipase de *Alcaligenes sp.* Verificou-se que, após 48 horas de reação, a porcentagem de hidrólise em gordura de porco aumentou para 84,5% e a hidrólise de óleo de mamona também aumentou para 81,5%. A porcentagem de hidrólise para gordura de leite de cabra foi de 62% em 96 horas de reação. A figura 14B mostra a

cromatografia dos produtos de hidrólise em diferentes substratos. Pode -se verificar que a lipase de *Alcaligenes sp*, hidrolisou os substratos óleo de oliva e gordura de porco, liberando (1) monoleína, (2,3) dioleína e ácido graxo. Para o substrato óleo de mamona, a lipase clivou o triglicerídeo liberando 2 tipos de monoleína (1) e (2), (2,3) dioleína e ácido graxo.

TALON *et alii* (70), também verificaram diferentes graus de hidrólise pela lipase de *Bochotrix thermosphacta* em diferentes substratos. A taxa de hidrólise para os substratos óleo de linhaça e gordura de porco, ricos em ácidos graxos insaturados foi superior em relação ao grau de hidrólise obtido para gordura bovina e de carneiro.

A lipase de *Pseudomonas sp.* isolada por YAMAMOTO *et alii* (81), hidrolisou preferencialmente óleo de mamona, em relação aos diversos substratos testados.

FU *et alii* (15), realizaram estudos referentes a hidrólise de vários substratos pela lipase de *Aspergillus sp.* A lipase hidrolisou os substratos: óleo de oliva, óleo de soja, toicinho, óleo de palma e gordura de côco, apresentando porém maior porcentagem de hidrólise para os substratos compostos em sua maioria por ácidos graxos insaturados como os óleos de oliva e soja.

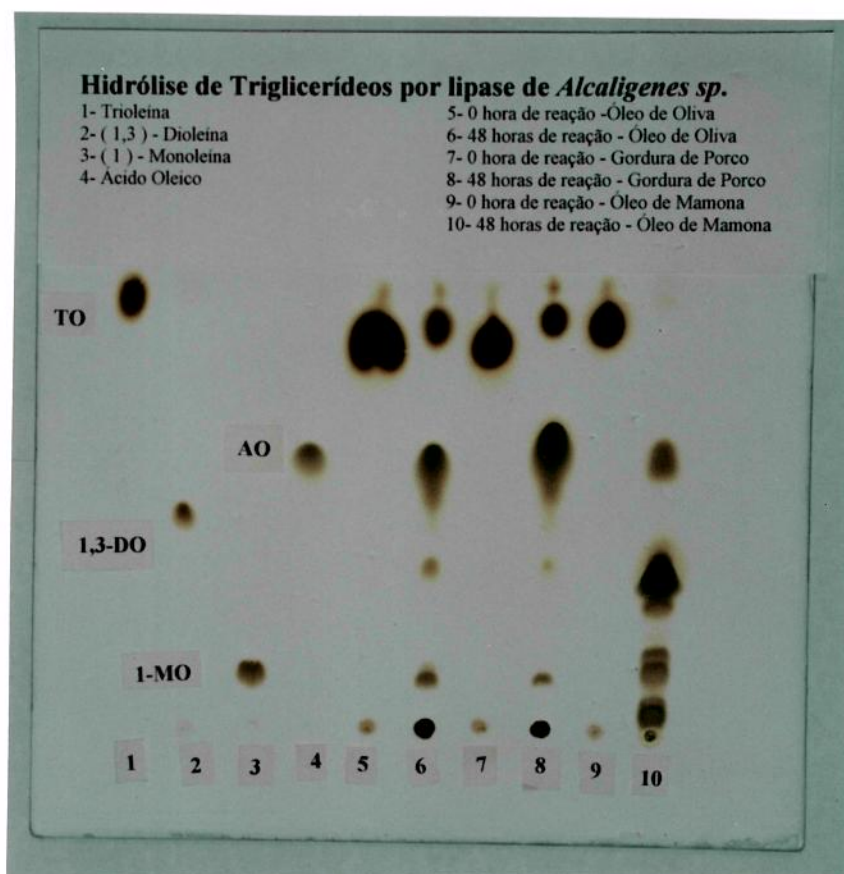


Figura 14B. Cromatografia dos produtos de hidrólise em diferentes substratos pela lipase bruta de *Alcaligenes sp.*

4.5.7 Estudo do efeito de sais minerais na atividade enzimática

O efeito de sais minerais na atividade de lipase foi verificada de acordo com o método descrito no item 3.2.10.8, utilizando óleo de oliva como substrato. Verificou-se que os sais FeSO_4 e HgCl_2 nas concentrações de 1 e 10 mM em relação ao volume final do sistema de reação, inibiram moderadamente a atividade da lipase de *Alcaligenes sp.* Os sais AgNO_3 e MnSO_4 não tiveram nenhum efeito sobre a atividade da lipase, no entanto, observou-se que a atividade de lipase foi fortemente ativada na presença de MgSO_4 e CaCl_2 nas concentrações de 1 e 10 mM em relação ao volume final do sistema de reação. A tabela 4 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 4. Efeito de sais minerais na atividade da lipase bruta de *Alcaligenes sp.*

sais minerais	% atividade relativa	
	1mM	10mM
KCl	75	70
ZnSO ₄	78	65
AgNO ₃	100	100
FeSO ₄	88	85
HgCl ₂	92,7	90
MnSO ₄	100	100
MgSO ₄	132	145
CaCl ₂	128	136
Na ₂ SO ₄	82	76
sem minerais	100	100

A lipase de *Alcaligenes sp.* foi significativamente ativada por íons Ca^{+2} e Mg^{+2} . Estes resultados são semelhantes aos dados obtidos por EITENMILLER *et*

alii (11), que verificaram o efeito ativador dos íons de Ca^{+2} e Mg^{+2} na lipase de *Penicillium roquefort*.

KHAN *et alii* (25), observaram que a lipase de *Achromobacter lipolyticus*, foi estimulada fortemente pela presença de Mg^{+2} , Na^+ , K^+ e Ca^{+2} , sendo o MgCl_2 de maior poder de ativação dentre os sais testados e CaCl_2 de menor poder de ativação.

4.5.8 Estudo do tempo de reação e porcentagem de hidrólise do óleo de oliva na presença de íons de Ca^{++} e Mg^{++}

O efeito do tempo de reação e porcentagem de hidrólise na presença de íons de Ca^{++} e Mg^{++} foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.8.1 utilizando óleo de oliva como substrato. A figura 15 ilustra os resultados obtidos. Foi verificado que a hidrólise máxima obtida foi 73,3% após 48 horas quando se utilizou somente CaCl_2 (110 mM) no sistema de reação. No sistema de reação contendo apenas MgSO_4 (110 mM) foi obtido 43% de hidrólise após 24 horas de reação, mantendo-se estável após esse período. Em sistema de reação composto por CaCl_2 e MgSO_4 (110 mM) foi verificado que a 24 horas de reação porcentagem de hidrólise foi de 44,2% e que após 48 horas de reação a hidrólise atingiu um máximo de 65%. Para o sistema de reação sem a presença de íons, foi observada uma hidrólise máxima de 25,8% após 72 horas de reação.

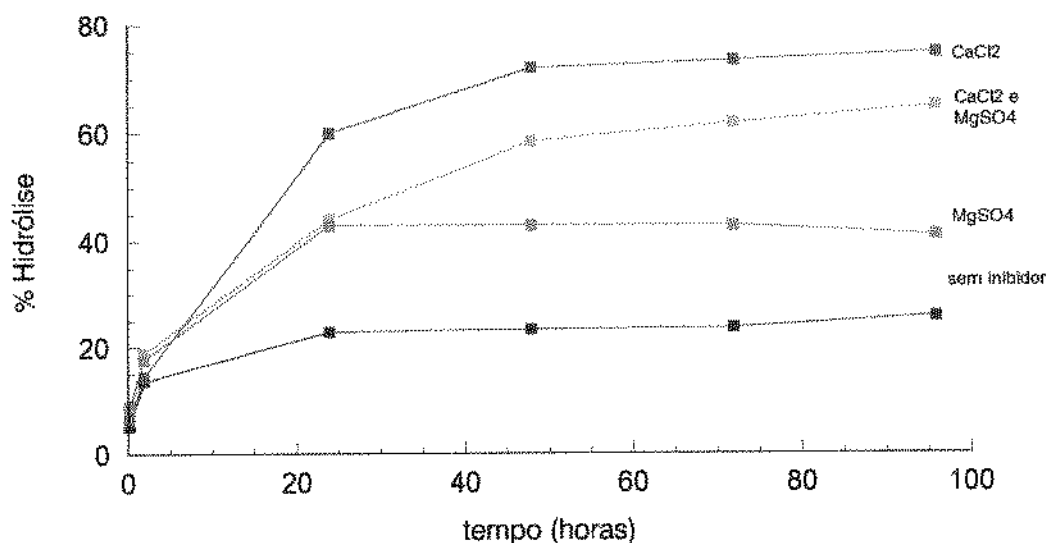


Figura 15. Curva de hidrólise do óleo de oliva na presença de Ca^{++} e Mg^{++}

Nesse experimento, pode-se observar que a lipase de *Alcaligenes sp* é dependente de íons para a atividade enzimática, sendo obtida uma hidrólise máxima acima de 70% quando somente o íon Ca^{++} esteve presente no sistema de reação.

Resultados semelhantes foram obtidos por TROLLER & BOZEMAN (72), que verificaram ser a hidrólise de trioleína pela lipase de *Staphylococcus*, dependente de íons Ca^{++} .

KIMURA *et alii* (28), verificaram que íons Ca^{++} ativaram a lipase pancreática na presença de sais biliares e colipase.

TSUJISAKA *et alii* (73), relataram que as lipases fúngicas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* foram ativadas por íons Ca^{++} . Foi verificado que a lipase de *Aspergillus niger* quando na presença de CaCl_2 foi ativada pelo íon de Ca^{++} na mistura de reação. A ativação, entretanto, não foi observada no começo da reação, indicando ser necessário acumular uma certa quantidade de ácido oléico para induzir a ativação. Este efeito foi comprovado quando foi adicionado íon cálcio após ter acumulado ácido oléico

no curso da hidrólise de óleo de oliva pela enzima, a reação foi rapidamente acelerada. Os autores consideram que o efeito da adição de cálcio parece ser devido ao aumento do estado de emulsificação da mistura pela formação de sais de cálcio com os ácidos graxos livres.

4.5.9 Efeito de inibidores na atividade da lipase

O efeito de inibidores na atividade de lipase de *Alcaligenes sp.*, foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.9, utilizando-se como substrato óleo de oliva para verificar a interferência dos reagentes na determinação da atividade enzimática. A tabela 5 traz os resultados obtidos.

Tabela 5. Efeito de inibidores de enzimas na atividade de lipase bruta de *Alcaligenes sp.*

reagentes	concentração	% atividade relativa
Iodoacetamida	1 mM	70
Cisteína	1 mm	69
p-cloromercuribenzoato	1 mM	70
β - mercaptoetanol	1 mm	55
Bissulfito de sódio	1 mM	54
sem inibidores	-----	100

Verificou-se que os reagentes β - mercaptoetanol e bissulfito de sódio inibiram significativamente a atividade enzimática, enquanto cisteína e iodoacetamida reduziram a atividade enzimática em cerca de 30%, indicando uma dependência de ligações S-S na atividade enzimática de *Alcaligenes sp.*

A lipase produzida por *Candida deformans* (40), foi inibida por reagentes ligadores de grupos tiol como paracloromercuribenzoato (PCMB) e iodoacetamida, indicando que o sítio ativo desta lipase pode conter grupos SH.

4.5.10 Estudo da ação hidrolítica da lipase alcalina quanto ao tipo de ácido graxo no triglicerídeo

O estudo da ação da lipase em relação aos substratos tricaprilina, tributirina, trioleína, trilaurina e tripalmitina foi testado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.10. A figura 16 demonstra os resultados obtidos.

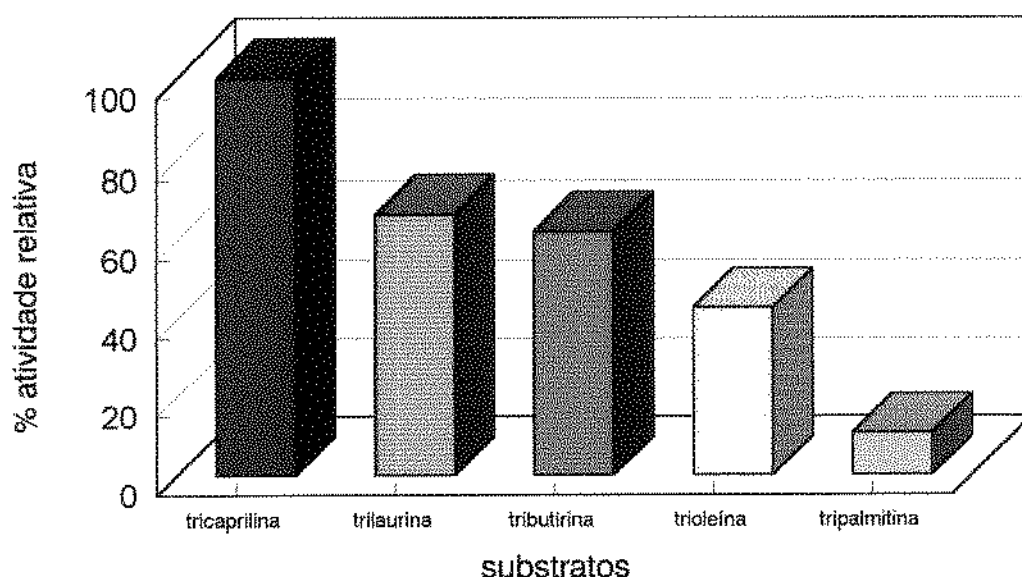


Figura 16. Estudo da ação hidrolítica da lipase alcalina em diferentes substratos.

A lipase de *Alcaligenes sp.* hidrolisou mais eficientemente os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia curta e média como tributirina (C_4), tricaprilina (C_8) e trilaurina (C_{12}), por outro lado, os substratos compostos por ácidos graxos de cadeia longa como trioleína, (C_{18}) e tripalmitina (C_{16}), foram hidrolisados em menor taxa.

Estes resultados foram semelhantes aos obtidos por OISAKA & TERADA (51), que estudaram as características de uma lipoproteína lipase (LPL) e lipase

isoladas de *Rhizopus japonicus* KY 521. Ambas enzimas hidrolisaram tricaprilina em maior proporção que os outros substratos testados.

PAPON & TALON (57), estudaram a especificidade das lipases de bactérias pertencentes ao gênero *Brochotrix thermosphaata* e *Lactobacillus curvatus* isoladas de leite. Dentre os substratos testados tais como tributirina, tripalmitina e trioleína, a máxima atividade de hidrólise encontrada foi em tributirina para as duas linhagens em estudo, indicando uma alta especificidade para os triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia curta.

IIZUMI *et alii* (22), estudaram a especificidade frente a diversos substratos pela lipase de *Pseudomonas sp*, sendo encontrado que tricaprilina, trimistirina e os óleos de soja, oliva e côco foram os substratos mais eficientemente hidrolisados pela lipase.

4.5.11 Estudo da ação de esterificação da lipase de *Alcaligenes sp*.

O estudo do tempo de reação e porcentagem de esterificação pela lipase de *Alcaligenes sp*. foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.11. A figura 17 ilustra os resultados obtidos

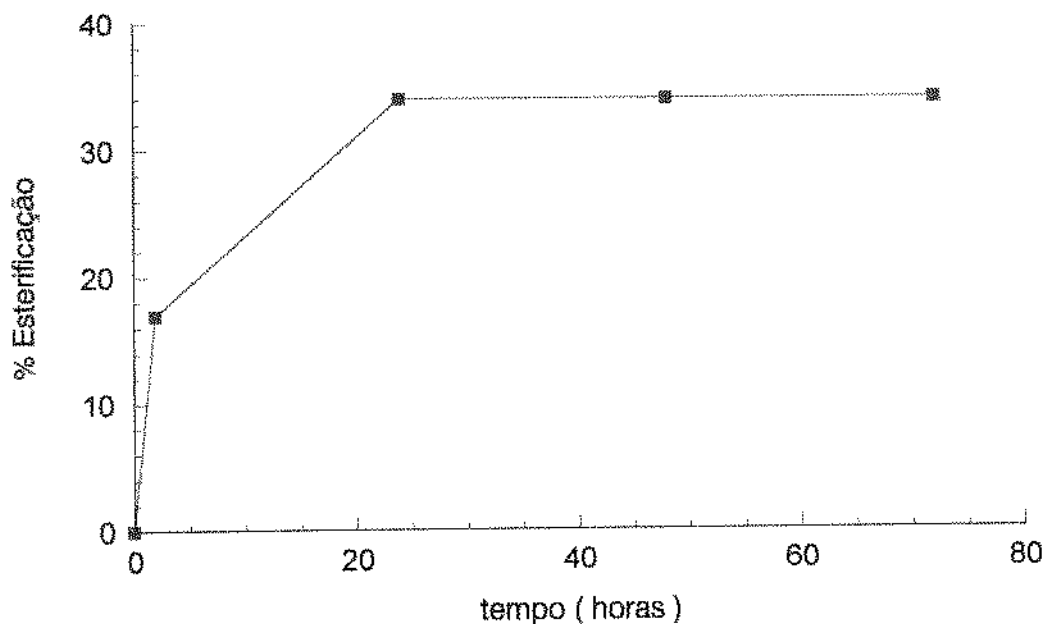


Figura 17. Esterificação de ácido oléico com glicerol pela lipase de alcalina.

Foi verificado neste experimento que a porcentagem de esterificação no período de 1 a 4 horas de reação foi de 17%, aumentando para 34 % após 24 horas de reação mantendo esta mesma taxa após 48 horas de reação. Pode-se observar por esses resultados que a lipase de *Alcaligenes sp* não é uma enzima com grande capacidade de esterificação, nas condições testadas. Sabe-se que a capacidade de esterificação está relacionada principalmente com o meio reacional, concentração de álcool e do ácido graxo .

PARK & PASTORE (58), descreveram estudos de esterificação de ácido graxo e glicerol por lipases microbianas. A esterificação de ácido oléico com glicerol foi estudada utilizando lipases de *Penicillium roquefort*, *Rhizopus delemar* e *Rhizopus niveus*. Os autores relataram que a esterificação máxima foi obtida quando a mistura de reação continha 0,9 g de ácido oléico, 8 g de glicerol e 0,4 mL de água na qual foi dissolvida a lipase e incubada a 40°C.

4.5.12 Purificação da lipase de *Alcaligenes sp.*

A purificação da lipase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.12.2.

O fluxograma da purificação da lipase de *Alcaligenes sp.* está descrito na figura 19.

A lipase de *Alcaligenes sp.* foi obtida por fermentação em meio líquido e posterior centrifugação do meio de cultivo e fracionamento com sulfato de amônio. No fracionamento da preparação bruta de lipase em coluna DEAE- Sephadex A-50 equilibrada com Tampão Tris- HCl pH 8,0 0,01M. Tendo sido obtida duas frações nos gradientes de concentração de 0,1M e 0,3M de NaCl. A figura 19 ilustra o fracionamento da lipase. A purificação está sumarizada na tabela 6. A enzima foi purificada 3 vezes após fracionamento com sulfato de amônio. Na figura 18 pode-se observar que na concentração de 0,1M de NaCl foram eluídas as frações com atividade lipolítica, sendo reunidas e concentradas e denominadas de Fração I com purificação de 5,06 vezes. Na concentração de 0,3 M de NaCl foi obtido outro conjunto de frações com atividade lipolítica, as quais foram reunidas e concentradas e denominadas de Fração II, sendo purificada 14,7 vezes. A fração II apresentou maior atividade lipolítica específica em relação a fração I.

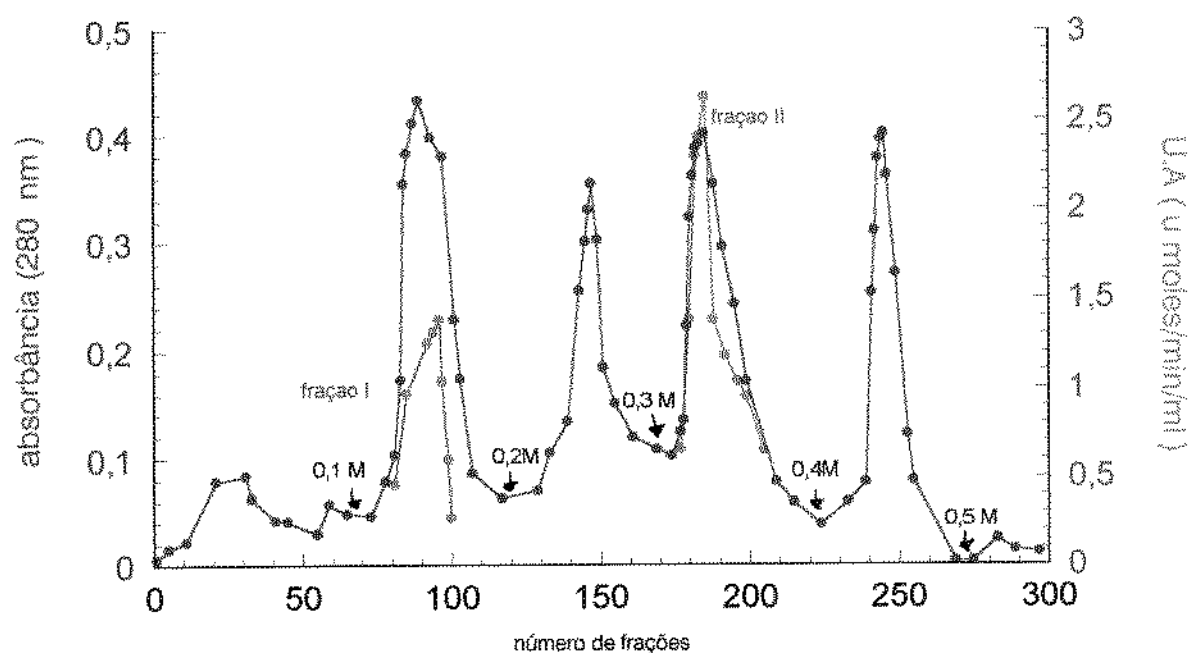


Figura 18. Cromatograma da purificação em coluna de DEAE Sephadex A-50 da lipase de *Alcaligenes sp.*

FOX & STEPANIAK (14), purificaram a lipase de *Pseudomonas sp.* A enzima foi purificada em DEAE Sephadex G-50 e filtração em gel Sepharose 6B.

Na cromatografia foram obtidas 3 lipases, as quais foram separadas por filtração em gel, sendo que a lipase principal, com 71% da atividade total, foi caracterizada.

OI *et alii* (50).realizaram a purificação da lipase de *Penicillium crustosum*. Os autores verificaram a presença de 3 tipos de lipase (I ~II) no fracionamento por cromatografia em coluna de DEAE- celulose. As lipases I e II foram purificadas e obtidas na sua forma cristalizada e analisadas quanto as suas características bioquímicas.

Figura 19. Fluxograma de produção e purificação da lipase de *Alcaligenes sp.*

Fermentação em frascos a 30°C com agitação de 100 rpm.



Centrifugação (5000 rpm x 25 min a 5°C)



Sobrenadante



Fracionamento com Sulfato de Amônio (80% saturação)



Centrifugação (5000 rpm x 20 min a 5°C)



Precipitado



Diálise (contra água destilada a 5°C)



Enzima bruta



Diálise (contra Tampão Tris - HCl 0,05 M pH 9,0)



Fracionamento em coluna DEAE Sephadex A- 50



Lipase purificada

Tabela 6. Purificação da lipase de *Alcaligenes sp.*

Etapa de procedimento	volume (L)	Unidades (μ moles/min)	Atividade total (U)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg proteína)	Purificação (%)	Recuperação (%)
Sobrenadante do meio de cultura	880	7,8	6864	2,4	3,2	1	100
Fracionamento com Sulfato de Amônio	15	54,4	816	5,53	9,8	3,0	12
Cromatografia - DEAE Sephadex Fração I	40	4,7	211	0,295	16,2	5,06	3,06
Cromatografia em DEAE Sephadex Fração II	45	6,6	264	0,140	47,1	14,7	3,8

4.5.13 Caracterização da lipase purificada de *Alcaligenes sp*

A caracterização bioquímica das frações lipolíticas purificadas de *Alcaligenes sp* foram determinadas como descrito nos itens 3.2.13.1 a 3.2.13.7.

4.5.13.1 Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade da enzima purificada foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.1.1.

A figura 20 mostra que o pH de máxima atividade para as frações I e II foi de 8 e 9 respectivamente, obtidos com tampão Tris - HCl 0,2M.

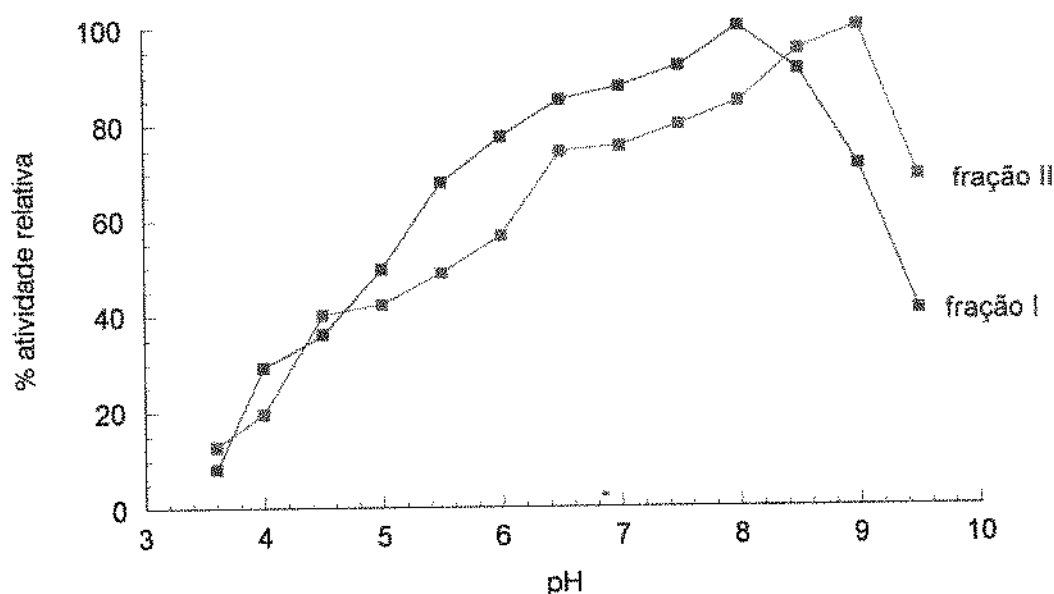


Figura 20. Efeito do pH na atividade das frações I e II.

TYSKI *et alii* (76), estudaram as características da lipase purificada de *Staphylococcus sp.* a lipase estudada, exibiu máxima atividade a pH 8, resultado esse semelhante ao encontrado para a fração I da lipase de *Alcaligenes sp.*, a fração

II, mostrou -se mais ativa em pH 9, semelhante aos dados obtidos por NISHIO *et alii* (46), para a lipase purificada de *Pseudomonas fragi* 22.39 B.

A lipase purificada de *Bacillus sp* (67), apresentou pH ótimo na faixa de 5,5 a 7,2 a 30°C, utilizando óleo de oliva como substrato.

As frações I e II da lipase purificada de *Trichosporon fermentans* WUC - 12 (7), apresentaram pH ótimo de 5,5 no substrato óleo de oliva.

4.5.13.2 Efeito do pH na estabilidade enzimática

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.13.1.2.

A figura 21 ilustra o efeito do pH na estabilidade das frações I e II. A fração I foi mais estável na faixa de pH entre 6 e 7, sendo que a pH maiores que 8,0 a fração enzimática ainda retém 59% de atividade lipolítica quando incubada por 24 horas. A fração II apresentou estabilidade frente ao pH situada na faixa entre 6 e 7,5 (Tampão fosfato 0,2M), retendo 66% de atividade quando incubada em pH 8 (Tampão Tris - HCl 0,2M) por 24 horas a temperatura ambiente, sendo pouco estável no lado alcalino do pH.

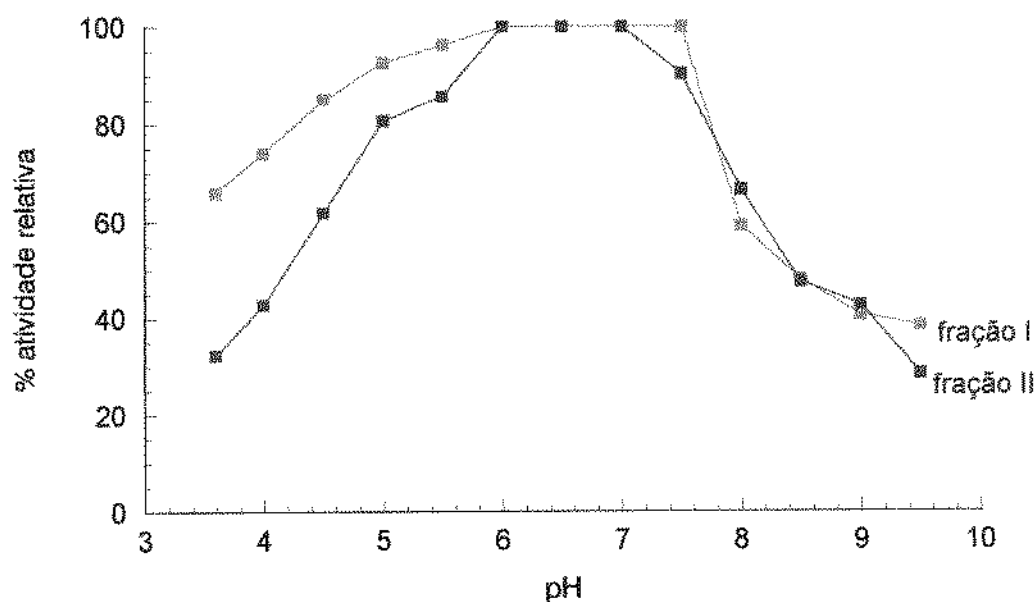


Figura 21. Efeito do pH na estabilidade das frações I e II.

As lipases purificadas I e II, de *Trichosporun fermentans* (7), apresentaram estabilidade quando tratadas em pH na faixa de 4 a 8 a 30°C por 24 horas.

NISHIO *et alii* (46), estudaram as propriedades da lipase purificada de *Pseudomonas fragi* 22.39B. A enzima foi estável na faixa de pH de 6,5 a 10,5 a 30°C e de 8,0 a 10,5 a 50°C após 24 horas de incubação, sendo portanto, estável no lado alcalino do pH.

A lipase purificada de *Pseudomonas sp* KWI - 56 estudada por IIZUMI *et alii* (22), apresentou pH de estabilidade na faixa de 4 a 10.

4.5.13.3 Efeito da temperatura na atividade enzimática

O estudo do efeito da temperatura na atividade enzimática foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.2.1.

A figura 22 ilustra o efeito da temperatura na atividade enzimática das frações I e II. A temperatura ótima de hidrólise em óleo de oliva para as frações I e II foi de 40°C e 45°C respectivamente em tampão Tris- HCl 0,2M pH 9.

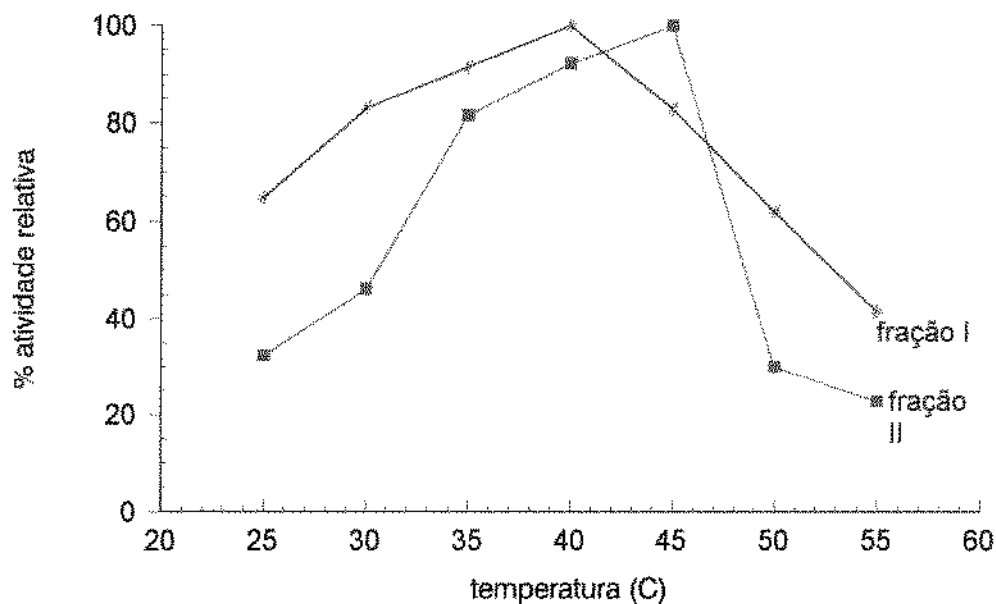


Figura 22. Efeito da temperatura na atividade das frações I e II.

FINKELSTEIN *et alii* (13), estudaram as propriedades bioquímicas da lipase purificada de *Pseudomonas aeruginosa*. A temperatura ótima encontrada foi 40°C.

A lipase parcialmente purificada de *Penicillium roquefort* (11), apresentou temperatura ótima de 37°C.

4.5.13.4 Efeito da temperatura na estabilidade enzimática

O estudo do efeito da temperatura na estabilidade das frações enzimática I e II foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.2.2.

A figura 23 demonstra que a estabilidade térmica da fração I esteve na faixa de 25°C a 40°C, retendo 93% de atividade quando incubada por 45°C, no entanto, quando a fração I foi incubada a 50°C perdeu 40 % de atividade lipolítica. A fração II foi estável na faixa entre 25°C e 35°C, retendo 65% de atividade quando

incubada a 45°C, porém, quando incubada a 50°C por 1 hora, a enzima perdeu 62% da atividade lipolítica.

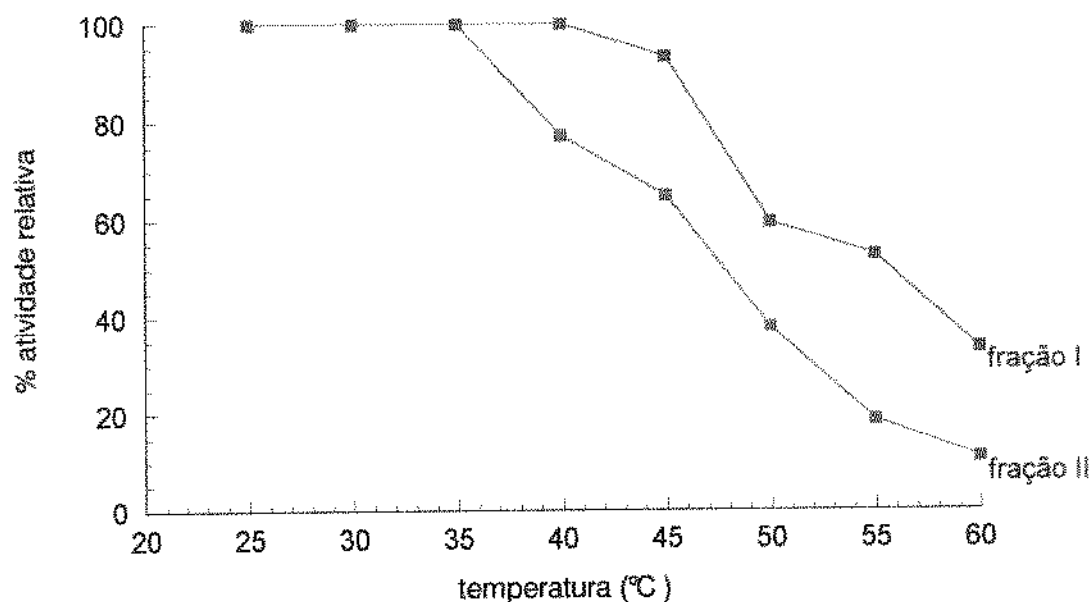


Figura 23. Efeito da temperatura na estabilidade das frações I e II.

Estes resultados diferem dos obtidos por OI *et alii* (50), na caracterização das lipases I e II, de *Penicillium crustosum*. Foi verificado que a lipase I apresentou termoestabilidade até 45°C, sendo completamente inativada a temperaturas acima de 80°C por 15 minutos e a lipase II foi também estável até 45°C.

A lipase purificada de *Streptococcus faecalis* (5), apresentou termoestabilidade até 40°C, quando aquecida por 10 minutos, sendo completamente inativada a 90°C.

MENCHER & ALFORD (39), estudando as características bioquímicas da lipase purificada de *Pseudomonas fragi* NRRL B-25, verificaram que a enzima tratada a 45°C por 10 minutos, foi completamente inativada.

A lipase de *Pseudomonas fluorescens* estudada por SUGIURA *et alii* (69), apresentou estabilidade quando incubada a temperaturas acima de 40°C em pH 7 por 30 minutos.

4.5.13.5 Efeito de sais minerais na atividade das frações I e II

O efeito de sais minerais na atividade das frações I e II da lipase purificada, foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.3. As tabelas 7A e 7B ilustram os resultados obtidos.

Tabela 7 A. Efeito de sais minerais na atividade lipolítica da fração I.

sais minerais	concentração	% atividade relativa
CaCl ₂	1 mM	176
MgSO ₄	1 mM	157
Na ₂ SO ₄	1 mM	61,8
AgNO ₃	1 mM	78,9
KCl	1 mM	40,7
ZnSO ₄	1 mM	64,4
FeSO ₄	1 mM	61,8
MnSO ₄	1 mM	132
sem minerais	----	100

Tabela 7B. Efeito de sais minerais na atividade lipolítica da fração II.

sais minerais	concentração	% atividade relativa
CaCl ₂	1 mM	163
MgSO ₄	1 mM	219
Na ₂ SO ₄	1 mM	45
AgNO ₃	1 mM	97
KCl	1mM	39,2
ZnSO ₄	1 mM	77,3
FeSO ₄	1 mM	88,0
MnSO ₄	1 mM	106
sem minerais	----	100

Foi verificado que os sais de Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺ na concentração de 1 mM em relação ao volume final da reação tiveram um efeito ativador na atividade lipolítica tanto da fração I quanto da fração II sendo esses resultados semelhantes aos obtidos pela lipase bruta de *Alcaligenes sp.* Os sais FeSO₄ e ZnSO₄ inibiram moderadamente ambas as frações I e II, por outro lado, a atividade lipolítica foi reduzida em mais da metade na presença de KCl.

As lipases purificadas I e II de *Penicillium crustosum*, estudadas por OI *et alii* (50), foram inibidas por íons Cu⁺⁺, no entanto, foi observado um aumento da atividade lipolítica em óleo de oliva, na presença de íons bimetálicos como Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺, no sistema de reação.

LU & LISKA (37), verificaram que a atividade da lipase purificada de *Pseudomonas fragi*. foi fortemente inibida na presença de íons Co⁺⁺, Zn⁺⁺ e Cu⁺⁺, no entanto, a atividade lipolítica não foi afetada na presença de Ca⁺⁺ ou NaF.

4.5.13.6 Efeito de inibidores na atividade enzimática das frações I e II.

O estudo do efeito de inibidores na atividade lipolítica das frações I e II foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.4. As tabelas 8A e 8B ilustram os resultados obtidos.

Tabela 8A. Efeito de inibidores na atividade enzimática da fração I.

Inibidores	concentração	% atividade relativa
paracloromercuribenzoato	1 mM	60
cisteína	1 mm	74
Iodoacetamida	1 mm	67
Bissulfito de sódio	1 mM	40
β -mercaptoetanol	1 mM	67
sem inibidores	-----	100

Tabela 8B. Efeito de inibidores na atividade enzimática da fração II.

Inibidores	concentração	% atividade relativa
paracloromercuribenzoato	1mM	74
cisteína	1mM	56,5
Iodoacetamida	1mM	65,2
Bissulfito de sódio	1mM	52
β - mercaptoetanol	1mM	56,5
sem inibidores	-----	100

Verificou-se neste experimento que as frações I e II foram fortemente inibidas pela presença de bissulfito de sódio, cisteína, β -mercaptoetanol na concentração de 1 mM em relação ao volume final do sistema de reação. Esses dados indicam que a atividade lipolítica das frações purificadas I e II é dependente de grupos SH.

A lipase de *Mucor pulsillus* (65), apresentou resultados opostos, pois a atividade enzimática não foi afetada por agentes redutores (cisteína, β -mercaptoetanol) ou por agentes quelantes como EDTA.

Inibidores enzimáticos como paracloromercuribenzoato (PCMB) não tiveram efeito inibidor na atividade lipolítica da enzima purificada de *Staphylococcus sp*, segundo dados relatados por TROLLER & BOZEMAN (72).

4.5.13.7 Hidrólise de óleo de oliva por ação lipolítica das frações I e II

O estudo da hidrólise de óleo de oliva pelas frações I e II foi realizado de acordo com o método descrito no item 3.2.13.5. Foi verificado neste estudo que a máxima atividade de hidrólise em substrato óleo de oliva pela fração I purificada ocorreu em 48 horas de reação e a 72 horas para a fração II purificada. As figuras 24 e 25 ilustram os resultados obtidos.

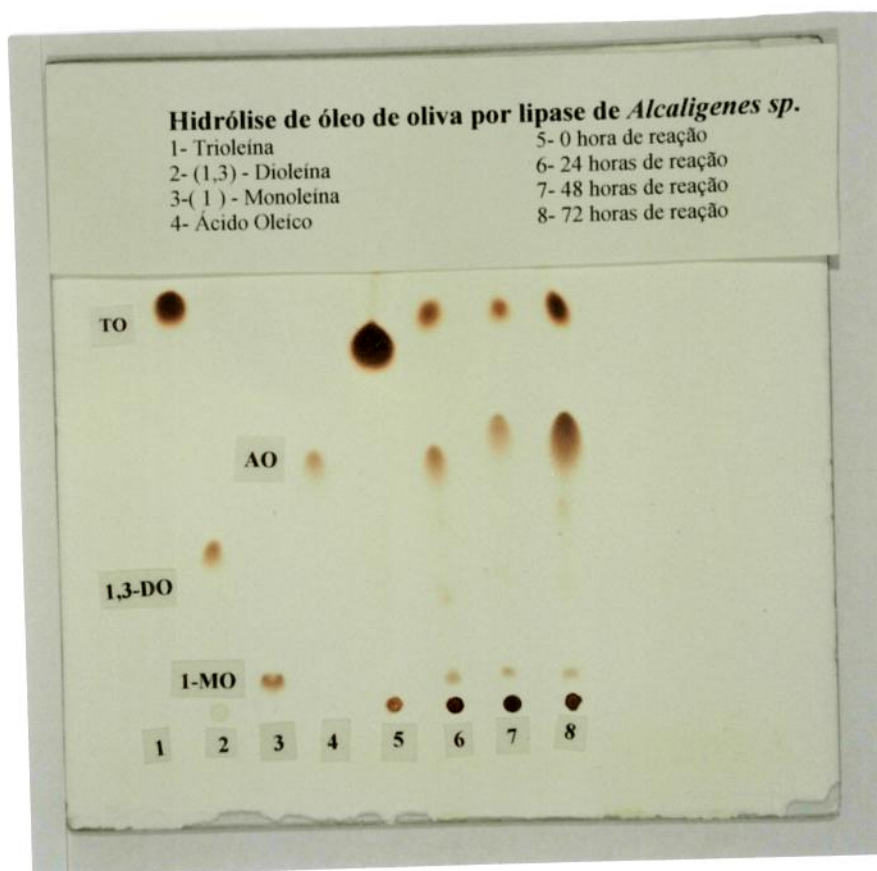


Figura 24. Cromatografia dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela fração I da lipase purificada de *Alcaligenes sp.*

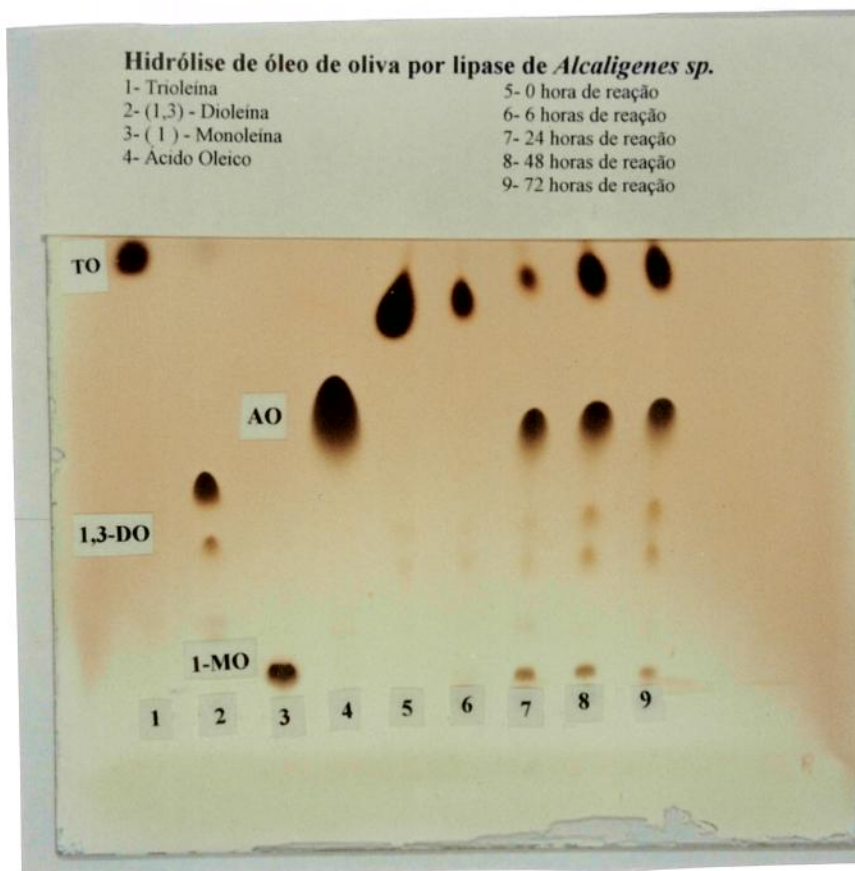


Figura 25. Cromatografia dos produtos de hidrólise de óleo de oliva pela fração II da lipase purificada de *Alcaligenes sp.*

A figura 24 mostra a cromatografia em camada delgada dos produtos de hidrólise em óleo de oliva pela fração I de *Alcaligenes sp.* Pode-se verificar que a fração I hidrolisou o substrato óleo de oliva liberando (1) monoleína, 1,2 (2,3) dioleína e ácido oléico. A figura 25 ilustra o cromatograma dos produtos de hidrólise em óleo de oliva pela fração II de *Alcaligenes sp.* A hidrólise realizada pela fração II foi semelhante a obtida pela fração I, na qual se obteve a liberação de (1) monoleína, 1,2 (2,3) dioleína e ácido oléico.

As lipases I e II purificadas de *Trichoporon fermentans* (7), hidrolisaram trioleína na posições 1,2 e 3 do triglicerídeo, indicando uma não especificidade quanto a posição de clivagem.

SUGIHARA *et alii* (66), estudaram as características das lipases purificadas I e IV de *Geotrichum candidum*. Foi verificado que quando trioleína foi utilizada como substrato pela lipase I, a quantidade de 1,2 (2,3) dioleína formada foi de 18 % sendo 2,2 vezes maior que 1,3 dioleína. A lipase IV teve um comportamento diferente, produzindo 1,3 e 1,2 (2,3) dioleína em 19% de hidrólise.

4.5.13.8 Determinação do teor de açúcares totais das frações I e II da lipase purificada

O teor de carboidratos totais presentes nas frações I e II foi determinado pelo método fenol- ácido sulfúrico (9), sendo encontrado um teor de 8,5% para a fração I e 10,9% para a fração II. Dados referentes a composição glicolipídica de lipases são relatados na literatura e indicam que manose é o principal açúcar constituinte da molécula enzimática, como os relatos descritos por HOFELMANN *et alii* (19) que estimaram os valores de 6 a 9% de manose nas frações I e II da lipase de *Aspergillus niger*.

TSUJISAKA *et alii* (75), estimaram o conteúdo de carboidratos da lipase purificada de *Geotrichum candidum* encontrando o valor de 7,5% de carboidratos, sendo a manose o principal componente.

4.5.13.9 Determinação do peso Molecular por Eletroforese Vertical em gel SDS-PAGE das frações I e II da lipase purificada de *Alcaligenes sp.*

A eletroforese da lipase purificada (frações I e II) de *Alcaligenes sp* foi realizada de acordo com o método de LAEMMLI (31) e coloração em prata pelo método de OAKLEY *et alii* (48). Foi verificado neste experimento que tanto a fração I e fração II da lipase purificada de *Alcaligenes sp* possuem 2 subunidades. O peso molecular aparente estimado para as 2 subunidades da fração I é de 10.700 e 8.500 daltons e para as 2 subunidades da fração II é de 11.200 e 9.000 daltons respectivamente. A figura 26 ilustra os resultados obtidos.

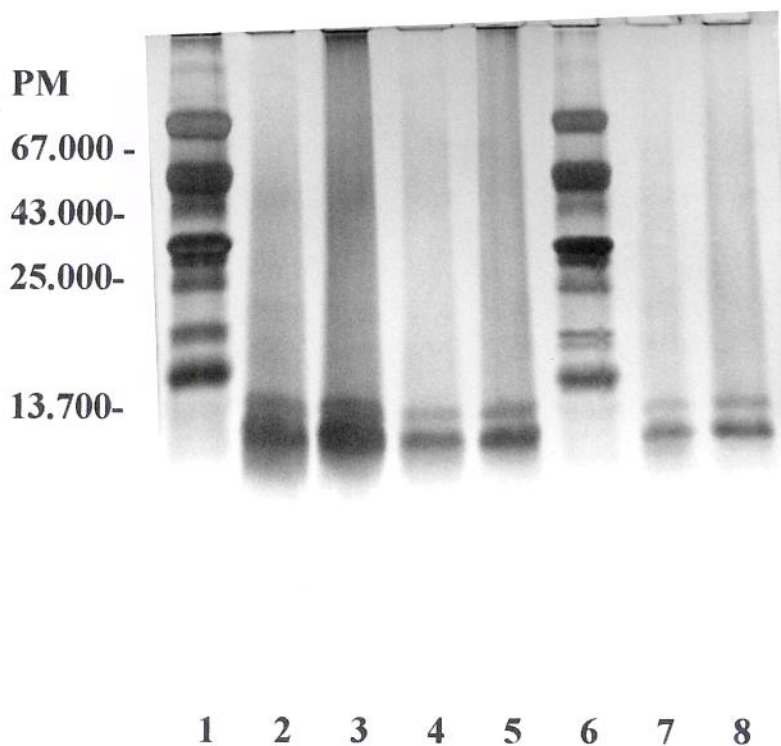


Figura 26. Eletroforese das frações I e II da lipase parcialmente purificada de *Alcaligenes sp* em gel de SDS - PAGE.

Peso Molecular - daltons

1 e 6 Padrões de Proteínas

67.000 Albumina de soro bovina

43.000 Albumina de ovo

25.000 Quimotripsina

13.700 Ribonuclease A

2 e 3 -Fração II : - 11.200 e 9.000

4,5,6,7 e 8 - Fração I :- 10.700 e 8.500

5- APLICACÕES

Nas últimas décadas houve um grande desenvolvimento da bioquímica de lipases microbianas aliada a extensas pesquisas quanto as propriedades, modo de ação enzimático e características do microrganismo produtor, visando a aplicação industrial.

SEITZ (62), relata a utilização comercial de lipases de origem microbiana (*Alcaligenes viscolatis*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluoresces*, *Achromobacter lipolyticus*, *Propionobacterium*, *Penicillium roquefort*) em indústrias alimentícias, particularmente em laticínios, na maturação de queijos sendo a sua ação importante no desenvolvimento de “flavors”.

HARPER & LONG (18), analisaram a influência de ácidos graxos livres em queijo provolone comercial, e verificaram que o tipo de ácido graxo formado dependia do tipo de lipase utilizada na sua produção, sendo que a intensidade do sabor desejável está relacionada com a concentração de ácido butírico produzido e ácido glutâmico liberado.

A produção de bebidas alcoólicas por processo fermentativo como “sake” também envolve o uso de lipases, que promovem a formação do aroma e acelera a fermentação pela remoção de lipídios.

Na área farmacêutica, lipases podem ser utilizadas para promover a digestão de óleos e gorduras dos alimentos, atuando como enzimas digestivas e em “Kits” diagnosticos de triglicerídeos sanguíneos.

Produtos cosméticos contendo lipase em sua composição mostram a sua eficácia na remoção de lipídios da epiderme.

POSORSKE (59), descreveu os benefícios industriais da aplicação de lipases para a indústria de óleos e gorduras, descrevendo as vantagens oferecidas pelas enzimas em relação aos processos químicos tradicionais que são: 1) especificidade

da enzima por posições nas cadeias do triglicerídeo, podendo ser 1,3 específica e não específica; 2) baixo custo e reduzido desperdício.

Novas aplicações de lipases como hidrólise de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos especiais, síntese de lipídios pela reação de esterificação e produção de lipídios estruturados e novos lipídios pela reação de interesterificação são assuntos para intensa investigação.

MACRAE (38), relatou a obtenção de misturas de triglicerídeos, que não podem ser obtidas por interesterificação química, pelo uso de lipases, considerando a sua especificidade. A interesterificação catalisada por lipase 1,3 específica do triglicerídeo 1,3 dipalmitoil - 2 monoleína (POP) que é a fração preponderante do óleo de palma com ácido esteárico, leva a obtenção de 1 (3) palmitoil - 3 (1) estearil - 2 monoleína e 1,3 diestearoil (SOS), que são os componentes principais da manteiga de cacau .

Algumas lipases microbianas com alto grau de especificidade para as posições 1 e 3 do triglicerídeo como as lipases de *Alcaligenes sp*, *Mucor miehei* (Liposyme) e a lipase de *Aspergillus oryzae* (Lipolase), podem ser utilizadas para modificações específicas do triglicerídeo e em sistemas detergentes. Lipases não específicas como das linhagens de *Candida cylindracea* e *C. curvata*, podem ser utilizadas na clivagem total de triglicerídeos liberando ácidos graxos e glicerol atuando na interesterificação e síntese de ésteres (77).

SEITZ (62), relata a utilização de lipases em sistemas de detergentes. Lipases microbianas (*Candida lipolytica*, *Candida cylindracea* e *Pseudomonas stutzeri*), são preferidas em relação às obtidas de plantas ou fonte animal, devido a sua maior adequação para a incorporação em sistemas detergentes e estabilidade frente ao surfactantes iônicos presente nas formulações de detergentes.

A lipase de *Alcaligenes sp*, apresentou ser mais ativa no lado alcalino do pH, a atividade máxima de hidrólise obtida foi em pH 9 com tampão Tris - HCl 0,2M. Esta característica nos estimulou a realizar alguns experimentos visando a aplicação

da lipase bruta em sistemas detergentes onde a faixa de pH está situada entre neutro e alcalino.

5.1 Estudo do efeito de compostos detergentes na atividade lipolítica de *Alcaligenes sp.*

O estudo do efeito de detergentes na atividade de lipase de *Alcaligenes sp* foi verificado de acordo com o item 3.2.10.7. A tabela 9 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 9. Efeito de compostos detergentes na atividade enzimática de *Alcaligenes sp.*

Compostos detergentes	% atividade relativa
STPP 0,1%	104
STPP 0,5%	100
STPP 1,0%	98
TRITON X -100 1%	100
SDS 0,25%	95
Sem detergente	100

Foi verificado neste experimento, que a lipase de *Alcaligenes sp.* mostrou-se estável quando incubada por período máximo de 24 horas na presença de soluções detergentes como Polifosfato Tetrassódico (STPP) em concentrações na faixa de 0,1 a 1% , Triton X-100 (isoeetil fenil polioxietileno) a 1% e SDS (Sódio Duodecil Sulfato) a 0,25%.

Por outro lado, as lipases alcalinas de *Pseudomonas nitroreducens* e *Pseudomonas fragi* (78), foram severamente inibidas na presença de surfactantes iônicos como SDS (sódio duodecil sulfato) e LBS (sódio duocibenzeno sulfato) na concentração de 0,04 % em relação ao volume final.

Os surfactantes SDS (sódio duodecil sulfato) e LBS (sódio duodecilbenzosulfato) e Triton X-100, inibiram a lipase de *Pseudomonas sp.* KWI - 56 (22).

LIN *et alii* (33), estudaram os efeitos de Triton X-100 na produção de lipase alcalina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F - 111. Os autores verificaram que a adição de 0,2 % de Triton X- 100 no meio de cultura aumentou a atividade em cerca de 50 vezes.

O objetivo desse experimento foi verificar a estabilidade da enzima frente a soluções detergentes, propriedade fundamental para a aplicação de enzimas em sistemas detergentes domésticos ou industriais.

5.2 Comparação do efeito de detergentes na atividade da lipase de *Alcaligenes sp* (lipase 212) e lipase comercial

O estudo do efeito de detergentes na atividade lipolítica da lipase de *Alcaligenes sp* e Lipolase foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.7.1 A figura 27 ilustra os resultados obtidos.

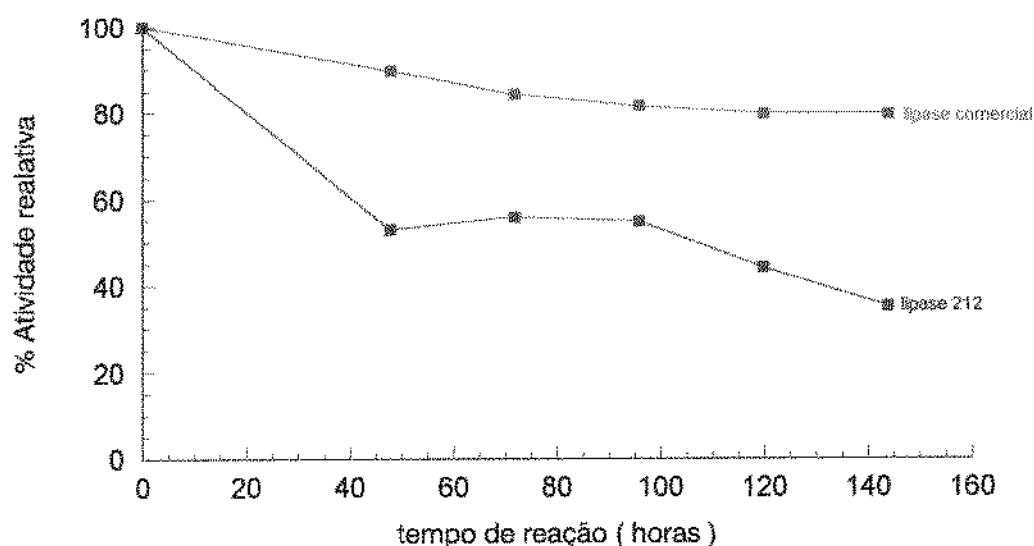


Figura 27. Efeito de detergentes na atividade enzimática da lipase de *Alcaligenes* lipase comercial.

A atividade da lipase de *Alcaligenes sp.* reteve mais de 50% de atividade quando incubada em solução detergente por 48 horas, retraindo ainda 40% de atividade mesmo após 148 horas de incubação. Por outro lado, a lipase comercial reteve 82 % de atividade após 148 horas de incubação, indicando uma estabilidade da enzima frente a compostos detergentes. É importante lembrar que a enzima comercial testada já se encontra na forma final de comercialização, com a incorporação de camada protetora.

5.3 Comparação do efeito de protease na atividade da lipase de *Alcaligenes sp.* e lipase comercial

O estudo do efeito de protease na atividade da lipase de *Alcaligenes sp* foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.17.7.2. A figura 28 ilustra os resultados obtidos.

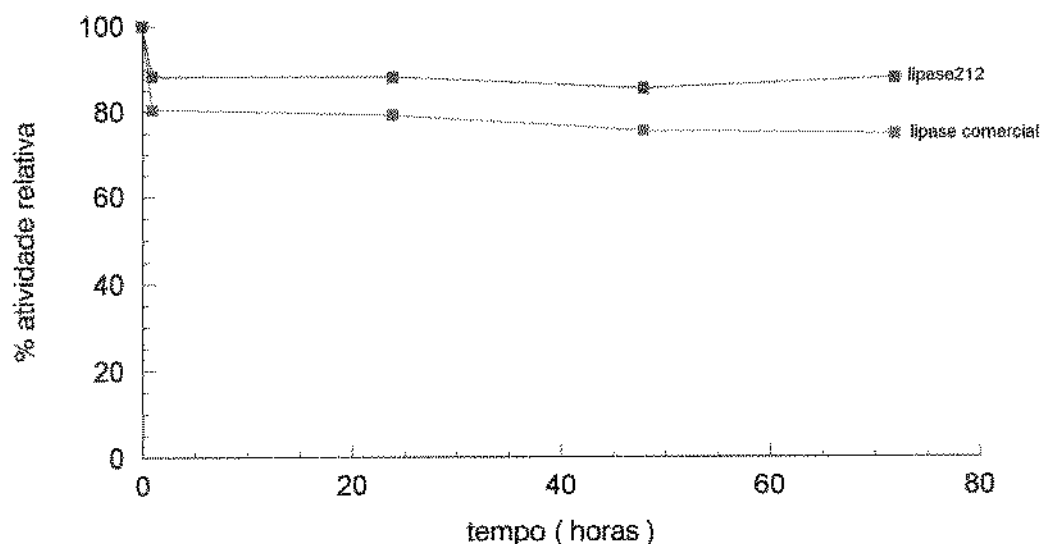


Figura 28. Efeito de protease na atividade enzimática das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial.

Foi verificado que lipase de *Alcaligenes sp* reteve 85,5% de atividade relativa após 72 horas de incubação em solução detergente contendo protease. A lipase comercial, reteve 78% de atividade após 72 horas de incubação.

O objetivo desse experimento foi, comparar a estabilidade das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial frente a soluções detergentes composta por proteases. É conhecido da literatura a utilização de proteases em várias aplicações industriais, na área de alimentos (manufatura de queijos e modificação de proteína), sendo também utilizadas em grande escala em detergentes de lavanderia, cuja função é a remoção de resíduos protéicos em superfícies. Lipases com potencial aplicação em formulações detergentes devem ser resistentes à ação de proteases colocadas no próprio sistema detergente. A protease empregada neste ensaio é a protease bacteriana utilizada nas formulações.

SEITZ (62), cita a composição de detergentes para a remoção de proteínas descritas em patente alemã (Henkel and Cie, G.m.b.H). Esta formulação era composta por 0- 1,0% de protease (Novo Enzyme Corp.) e 0,05% de lipase de *Candida cylindracea* (Lipase My - Meito Sangyo Co.).

5.4 Efeito da temperatura na atividade das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.7.3. A figura 29 ilustra os resultados obtidos.

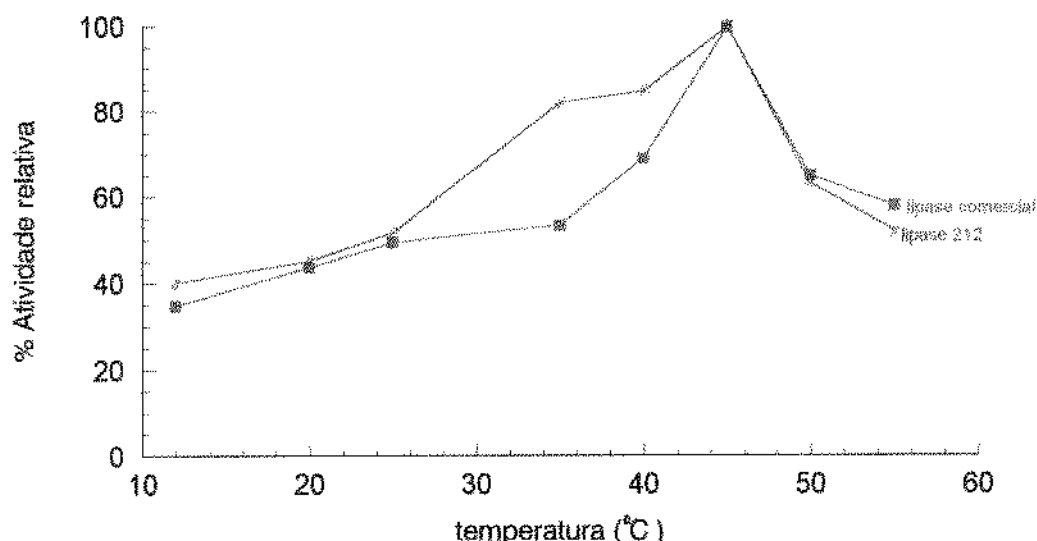


Figura 29. Efeito da temperatura na atividade da lipase de *Alcaligenes sp* e lipase comercial.

A máxima atividade lipolítica obtida pelas lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial foi de 45°C em Tampão Tris - HCl 0,2M pH 9.

5.5 Efeito do pH na atividade das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial

O efeito do pH na atividade das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial, foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.7.4. A figura 30 ilustra os resultados obtidos.

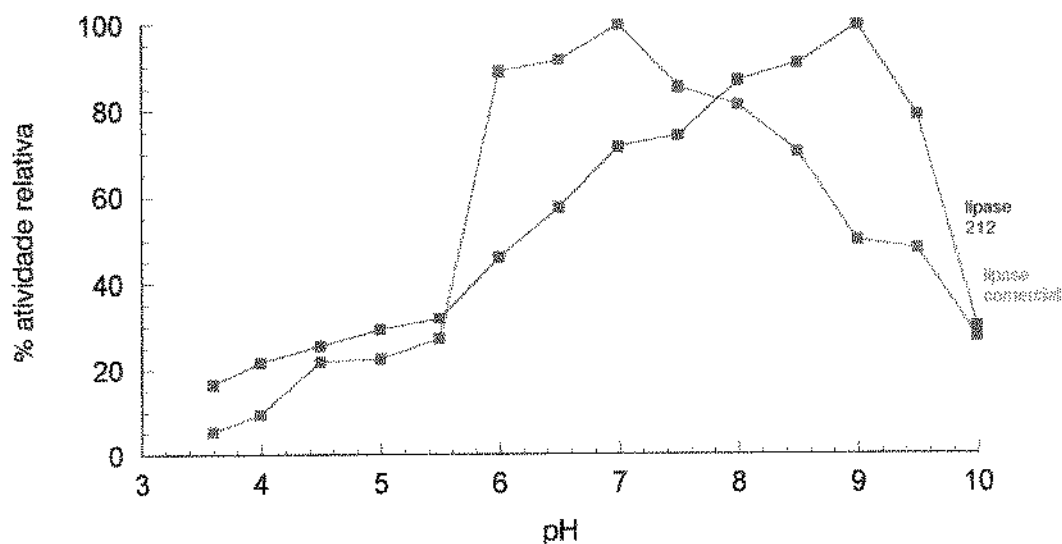


Figura 30. Efeito do pH na atividade das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial.

A máxima atividade lipolítica obtida pela lipase de *Alcaligenes sp* foi em tampão - Tris - HCl 0,2M pH 9. A lipase comercial apresentou um máximo de atividade em tampão fosfato pH 7 na concentração de 0,2M.

Do ponto de vista industrial, pH e temperatura são fatores importantes, que determinam se a utilização da enzima para fins industriais é válida ou não para um determinado processo. A tabela 10 ilustra dados referentes a pH e temperatura de algumas lipases comerciais.

Tabela 10. Características das lipases microbianas comerciais .

Fabricante	Nome comercial	Fonte microbiana	pH ótimo	temperatura ótima (°C)
Amano				
Pharmaceutical	Lipase - AP	<i>Aspergillus sp</i>	6,5	37
Amano				
Pharmaceutical	Lipase- MAP	<i>Mucor sp</i>	7,0	37
Meito Sangyo	Lipase- MY	<i>Candida cylindracea</i>	6,5	40
Nagase	Lipase sikin	<i>Rhizopus sp</i>	7,0	40
Rohm and Haas	Lipase B	<i>Aspergillus niger</i>	6,0	47,5
Toyo Jozo K.K.	Lipase toyo	<i>Chromobacterium</i> <i>viscosum</i> v. <i>paralipolyticum</i>	----	----
Tanabe seyaku	Lipase R. H	<i>Rhizopus delemar</i>	5,6	45
Osaka saikin	Lipase saikin,Olipase	<i>Rhizopus sp</i>	---	--
SEITZ (62)				

Como pode ser verificado a grande maioria de lipases comercializadas na atualidade são lipases que atuam em pH neutro ou ligeiramente ácido (pH 5 a 7).

5.6 Ação das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial na remoção de óleo de oliva em tecido de algodão

O efeito das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial na remoção de óleo de oliva em tecido de algodão foi verificado de acordo com o método descrito no item 3.2.10.7.5. A figura 31 ilustra os resultados obtidos.

Para quantificar a área de remoção lipídica dos sistemas estudados, foi utilizado o corante Sudan IV.

Sudan IV é um corante lipofílico que em contato com óleo apresenta uma coloração vermelha intensa, ao contrário, na ausência de substâncias lipídicas, apresenta coloração marron, sendo assim, esta característica foi utilizada para quantificar área de remoção lipídica, indicativa da ação enzimática sobre o óleo incorporado no tecido de algodão.

Podemos verificar que quando as lipases de *Alcaligenes sp* e Lipolase comercial, foram incorporadas no sistema de detergente, na concentração de 1%, a quantidade de óleo removido do tecido aumentou em relação ao sistema de reação composto somente por detergente. Foi- verificado que o grau de remoção de óleo no sistema contendo lipase de *Alcaligenes sp*, foi superior ao sistema contendo lipase comercial na mesma concentração, o que pode ser observado pela coloração marron escura apresentada pelo tecido. O objetivo desse experimento foi verificar a habilidade hidrolítica da lipase de *Alcaligenes sp*, na remoção de lipídios em tecidos, visando uma possível aplicação através da incorporação em sistemas detergentes de lavanderia.

FUJI *et alii* (16), realizaram estudos de remoção de óleo de oliva em tecido de algodão pela lipase de *Candida cylindracea*. Segundo os autores, a concentração de enzima empregada está relacionada ao grau de remoção de óleo de oliva.

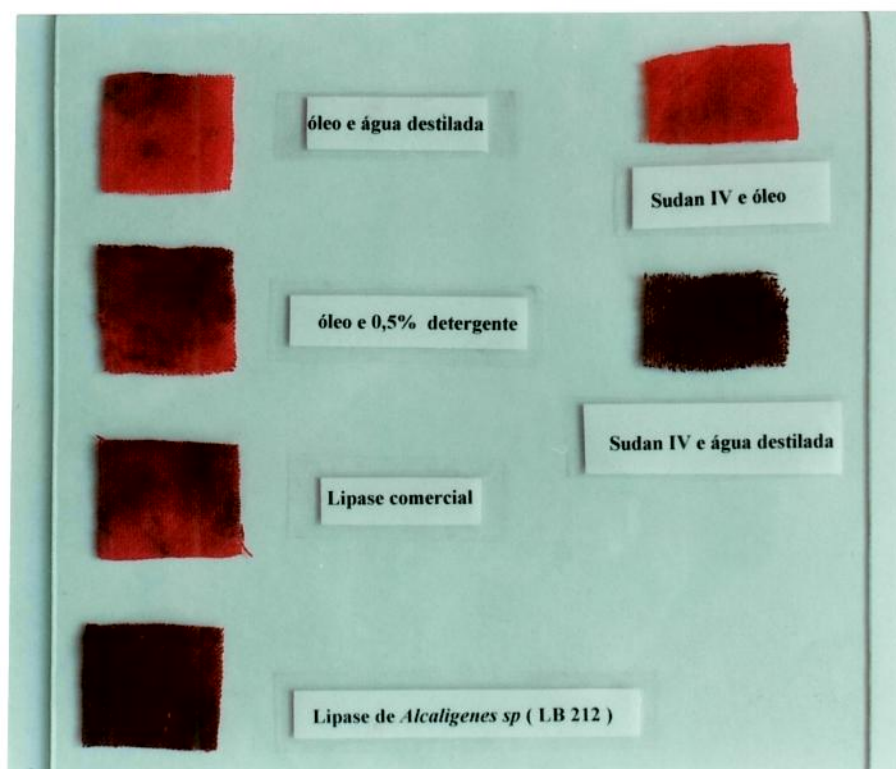


Figura 31. Ação das lipases de *Alcaligenes sp* e lipase comercial na remoção de óleo de oliva impregnado em tecido de algodão.

6- CONCLUSÕES

6.1 Das linhagens isoladas e testadas, a linhagem de nº 212 que apresentou maior atividade lipolítica, foi identificada como *Alcaligenes sp.*

6.2 *Alcaligenes sp.* produz lipase extracelularmente e hidrolisa éster de triglicerídeo liberando ácidos graxos e glicerol.

6.3 A produção máxima da enzima com 9 unidades de atividade por ml centrifugado de meio de cultura, foi obtida em meio de cultivo composto por: 2 % de farinha de soja torrada, 1% de farinha de trigo, 0,5 % de fosfato de potássio bibásico, 1% de água de maceração de milho, após 72 horas de incubação a 30° C.

6.4 A enzima apresentou atividade ótima a 45°C em tampão Tris- HCl 0,2M pH 9 e foi estável na faixa de pH de 6,5 e 8,5. A lipase reteve 90% de atividade quando tratada a 40°C por 1 hora e a 50°C a enzima perdeu 40 % de atividade.

6.5 A atividade da lipase de *Alcaligenes sp.* foi inibida na presença de KCl e ZnSO₄ na concentração de 1 mM no meio de reação. A enzima tem a sua atividade acrescida em 32 % na presença de MgSO₄ no sistema de reação.

6.6 Verificou-se que a lipase de *Alcaligenes sp.* é afetada por inibidores enzimáticos tanto na sua forma bruta quanto na forma purificada. As frações I e II da lipase purificada foram fortemente inibidas por β-mercaptoetanol e paracloromercuribenzoato (PCMB), demonstrando uma dependência das ligações S-S na atividade catalítica da enzima.

6.7 A eletroforese vertical em gel de SDS PAGE da lipase parcialmente purificada de *Alcaligenes sp.*, mostrou que tanto a fração I quanto a fração II da lipase parcialmente purificada de *Alcaligenes sp.*, apresentam 2 subunidades com peso molecular estimado em 10.700 e 8.500 daltons para a fração I e 11.200 e 9.000 daltons para a fração II.

6.8 A lipase de *Alcaligenes sp* atua melhor em triglicerídeos compostos por ácidos graxos de cadeia média e curta como tricaprilina, trilaurina e tributirina que em triglicerídeos formados por ácidos graxos de cadeia longa como trioleína e tripalmitina.

6.9 A porcentagem de esterificação de ácido oléico com glicerol pela lipase de *Alcaligenes sp.* teve um máximo de 34 % em 48 horas de reação.

6.10 A lipase bruta de *Alcaligenes sp.* mostrou-se estável na presença de compostos detergentes iônicos e não iônicos e protease comumente empregados em formulações para detergentes, podendo ter potencial aplicação nesta área.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALFORD, J. A.; ELLIOT, L. E. Lipolytic activity of microorganism at low and intermediated temperatures. I Action of *Pseudomonas fluorescens* on lard. Food Research, v. 25, p. 296 - 303, 1960 .
2. ALFORD, J. A.; PIERCE, D.A. Production of lipase by *Pseudomonas fragi* in a synthetic medium. Journal Bacteriology, v. 86, p. 24 - 29, 1963.
3. BAILLARGEON, M. W.; MC CARTHY, S. G. *Geotrichum candidum* NRRL Y - 553 Lipase: Purification , characterization and fatty acid specificity. Lipids , v. 26, n.10, p. 831 - 836, 1991.
4. BHUSHAN, B.; HOODAL, G. S. Characterization of lipase from an alkalophilic yeast sp. Biotechnology Letters , v. 16 , n. 8 , p. 837 - 40, 1994.
5. CHANDER, H.; RANGANATHAN, B.; SINGH, J. Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. Journal of Food Science, v. 44, p. 1747 - 51, 1979.
6. CHEN, J.; ISHI, T.; SHIURA, S. KIRIMURA, K.; USAMI, S. Lipase production by *Trichosporon fermentans* WUC 12 , a newly isolated yeast, Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 73, n.5, p. 412 - 414, 1992.
7. CHEN, J.; SHIMURA, K.; USAMI, S. Purification of extracellular lipases from *Trichosporon fermentans* WUC12. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.77 n.5, p. 548 - 550, 1994.
8. CUTCHINS, E. C.; DOESTCH, R.; PELCZAR, M. Jr. The Influence of medium composition on the production of bacterial lipase. Journal Bacteriology, v. 63, p. 269 - 272, 1952.
9. DUBOIS, M.; GILLES , K. A.; HAMILTON, J. K.; RIBUS, P. A.; SNITHY, T. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analytical Chemistry, v.28, p. 350, 1956.
10. DUPUIS, C.; CORRE, C.; BOYAVAL, P. Lipase and esterase activities of *Propionobacterium freudenreichii* sbsp. *freudenreichii*. Applied and Environmental Microbiology, v.59, n. 12, p. 4004 - 4009, 1993.

11. EITENMILLER, R. R.; VAKEL, J. R.; SHAHAN, K. M. Production and properties of *Penicillium roquefort* lipase. Journal of Food Science, v. 35, p. 130 - 133, 1970.
12. ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRES, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB - H 313. Biotchenology Letters, v. 12, n.3, p. 209 - 214, 1990.
13. FINKELSTEIN, A. E.; STRAWICH, E. S.; SOMINO, S. Characterization and partial purification of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 108, p. 380 - 390, 1970.
14. FOX, P.; STEPANIAK, L. Isolation and some properties of extracellular heat - stable lipase from *Pseudomonas* strain AFT 36. Journal of Dairy Research, v. 50, p. 77 - 89, 1983.
15. FU, X.; ZHU, X.; GAO, K.; DUAN, J. Oil and fat with lipase from *Aspergillus* sp. Journal American Oil Chemist's Society, v. 72 , n. 5, p. 527 -531, 1995.
16. FUJI, T.; TATARA, T. Studies on application of lipolytic enzyme in detergency. Effect of lipase from *Candida cylindracea* on removal of olive oil from cotton fabric. Journal American Oil Chemist's Society, v. 63, n.6, p. 796- 799,1984.
17. GUSTONE, F.D. ; HAWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. The lipid handbook, 2 ed., New York: Chapmam & Hall, p. 118-119, 1994.
18. HARPER, W. J.; LONG, J. E. Italian cheese ripening. IV. Various free amino and fatty acids in commercial provolone cheese. Journal of Dairy Science, v. 39, n.2, p. 129 - 137, 1956.
19. HOFELMANN, M.; HATRMANN, J.; ZUNK, A.; SCHREIER, P. Isolation, purification and characterization of lipase isoenzyme from a technical *Aspergillus niger* enzyme. Journal of Food Science, v. 50, p. 1721 - 1725, 1985.
20. HOU, C. pH dependence and thermoestability of lipase from cultures from the AARSCulture Collection. Journal of Industrial Microbiology, v.13, p. 242 - 248, 1994.
21. IIZUMI, T.; FUKASE, T. Role of the gene ecoding lipase activation from *Pseudomonas* sp. strain KWI - 56 "in vitro" activation of lipase. Bioscience and Biotechnology Biochemistry, 58, n.6, p. 1023 - 1027, 1994.

22. IIZUMI, T.; NAKAMURA, K.; FUKASE, T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI - 56. Agricultural and Biological Chemistry, v. 54 , n.5, p. 1253 -1258, 1990.
23. IWAI, M; TSUJISAKA, Y.; FUKUMOTO, J. Studies on lipase III. Effect of calcium ion on the action of crystalline lipase of *Aspergillus niger*. Journal General Applied Microbiology, v.10, p. 87 - 93, 1964
24. JONSSON, U.; SNYGG, B. G. Lipase production and activity as a function of incubation time, pH and temperature of four lipolytic microorganism. Journal of Applied Bacteriology, v. 37, p. 571 - 581, 1974.
25. KHAN, I. M.; DILL, C. W.; CHANDAM, R. C.; SHAKAN, K. M. Production and properties of extracellular lipase of *Achromobacter lipolyticum* . Biochimica et Biophysica Acta, v. 132, p. 68 - 77, 1967.
26. KHEIROLOMOON, M.; YOSHIDDA, K.C. , KALOOH, S. ; SADA, E. Substrat specificity and positional preference of a lipoprotein lipase. Journal of Fermentation and Bioengineering v. 73, n.5, p. 403 - 404, 1992.
27. KIM, K.H.; KWAN, D. Y.; RHEE, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. Lipids, v. 19, n.2, p. 975 - 977, 1984.
28. KIMURA, H.; FUTAMI, Y.; TANEL, S.; SHINONIYA, T. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts. Journal of Biochemistry, v. 92, p. 243 - 251, 1982.
29. KOKUSHO, Y.; MACHIDA, H. ; IWASAKI , S. Studies on alkaline lipase : isolation and identification of lipase producing microorganisms. Agricultural and Biological Chemistry, v. 46, n.5, p. 1159 - 1164, 1982.
30. KRIEG, R. N.; HOLT, G.J. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore. Willians & Wilkins, 1984. v.1, p. 365 - 373.
31. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structrure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.277, p. 680 - 685, 1970.
32. LAWRENCE, R. C. Microbial lipases and related esterases. Detection, distribution and production of microbial lipases. Dairy Science Abstrats, v. 29, n.1, p. 1 - 8, 1967 .

33. LIN, S. F.; CHIOU, M. C.; TSAI, Y. C. Effect of Triton X - 100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F - 111. Biotechnology Letters, v. 17, n. 9, p. 959- 962, 1995.
34. LINFIELD, W. M., BARASKAS, R.A.; SIVENTI, L.; SEROTA, S.; STEVENSON Sr, R. W. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. Journal American Oil Chemist's Society, v. 61, n. 2, p. 191 - 195, 1984.
35. LINFIELD, W.M.; SEROTAS, S.; SIVIERI, L. Lipid- lipase interations . II a new method fo the assay of lipase activity. Journal American Oil Chemists' Society, v. 62, n.7, p. 1152- 1154, 1985.
36. LOWRY, O. H.; ROSEBRAUGH, A.L.; RANDALL, R. F. Protein measurement with Folin - phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v.193, p. 265 - 275, 1951.
37. LU, J. Y.; LISKA, B. J. Lipase from *Pseudomonas fragi*. II Properties of the enzyme. Applied Microbiology, v. 18, n.1, p. 108 - 113, 1969.
38. MACRAE, A.R. Lipase- catalysed interesterification of oils and fats. Journal American Oil Chemist's Society, v. 60 , n. 2, p. 291- 294, 1983.
39. MENCHER, J. R.; ALFORD, J. A. Purification and characterization of the lipase of *Pseudomonas fragi*, Journal General Microbiology, v. 48, p. 317 - 328 , 1967.
40. MUDERHWA, J. M.; RATOMAHENINA, R. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerra. Journal American Oil Chemist's Society, v. 62, n.6, p. 1031 - 1036, 1985.
41. MUKESH, D.; IYER, R. S.; WANGH, J. S.; NAKASHI, A. A.; BANERJI, A. A; NEWARDAKAR, R. V.; BEVINAKATTI, H. S. Lipase catalysed transesterification of castor oil. Biotechnology Letters, v. 15, n.3, p. 251 - 256, 1993.
42. MUSTRANTA, A.; FOSSEL, P.; POUTANEN, K. Application of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. Enzyme and Microbial Technology, v. 15, p. 133 - 139, 1993.
43. NAIR, C.S.; BONE, O. H. Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in batch stirred reactor. Biotechnology Letters, v.9, n. 8, p. 601 - 604, 1987.

44. NAKA, Y.; NAKAMURA, T. Effects of colipase , bile salts, Na⁺, and Ca⁺⁺ on pancreatic lipase activity. Bioscience Biotechnology Biochemistry, v. 58, n. 11, p. 2121 - 2122, 1994.
45. NASHIF, S.A.; NELSON, F.E. The lipase of *Pseudomonas fragi* II . Factors affecting lipase production. Journal of Dairy Science, v.36, p. 471 - 480, 1952.
46. NISHIO, T. ; CHIKANO, T. KAMIMURA, M. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B. Agricultural and Biological Chemistry, v.51, n. 1, p. 181 - 186, 1987.
47. NISHIO, T. CHIKANO, T.; KAMIMURA , M. Substrate specificity and mode of action of the lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B. Agricultural and Biological Chemistry, v. 51 , n.9, p. 2525 -2529, 1987.
48. OAKLEY, B. R. ; KIRSCH , D.R. ; MORRIS , N. P. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrilamide gels. Analytical of Biochemistry, v. 105, n. 2, p. 361 - 363, 1980.
49. OHNISHI, K. ; YOSHIDA, Y. SEIKIGUCHI, J. Lipase production of *Aspergillus oryzae*. Journal of Fermentation and Bioengineering v. 77, n.5, p. 490 - 495, 1994.
- 50.OI, S.; SAWADA, A.; SATOMURA, Y. Purification and some properties of two types of *Penicillium* lipase, I and II , and conversion of types I and II under various modification conditions. Agricultural and Biological Chemistry, v. 31, n. 11, p. 1357 - 1366, 1967.
51. OISAKA, K.; TERADA, O. Purification and some properties of lipoprotein lipase from *Rhizopus japonicus*. Agricultural and Biological Chemistry, v. 44, n. 4, p. 799 - 805, 1980.
52. OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional Specificities of Four Kinds of Microbial Lipases. Agricultural and Biological Chemistry, v. 40, n.4, p. 655 - 660, 1976.
53. OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agricultural and Biological Chemistry, v. 45, n.1, p. 185- 189, 1981.

54. PABAI, F.; KERMASHA, S.; MORIN, A. Lipase from *Pseudomonas fragi* CRDA 323 : Partial purification, characterization and interesterification of butter fat. Applied Microbiology Biotechnology, v. 43 , p. 42- 51, 1995.
55. PAL, N.; DAS, S.; KUNDU, A.R. 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. PAPON, M.; TALON, R. Factors affecting growth and lipase production by meat *Lactobacilli* strains and *Brochotrix thermosphacta*. Journal of Applied Bacteriology, v. 64, p. 107 - 115, 1988.
57. PAPON, M.; TALON, R. Cell location and partial characterization of *Brochotrix thermosphacta* and *Lactobacillus curvatus* lipases. Journal of Applied Bacteriology, v. 66, p. 235 - 242, 1989.
58. PARK, Y.K.; PASTORE, G. M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 9, n.2, p. 167 - 171, 1989.
59. POSORSKE, L.H. Industrial -scale application of enzymes to the fats and oil industry. Journal American Oil Chemist's Society, v. 61, n.11, p. 1758 - 1760, 1984.
60. RAPP, P.; BACKHAUS, S. Formation of extracellular lipases by filamentous fungi, yeasts and bacteria. Enzyme and Microbial Technology, v. 14, p. 938 - 943, 1992.
61. SAGGERS, B. A.; STEWART, G. T. Lipolytic Esterase in *Staphylococci*. Journal of Bacteriology, v. 96, n. 4, p. 1006 - 1010, 1968.
62. SEITZ, E. W. Industrial application of microbial lipase: a review. Journal American Oil Chemist's Society, v.51, p. 12 - 16, 1974.
63. SHAW, J.F; WANG, D. L. Lipase catalysed ethanolysis and isopropanolysis of triglycerides with long - chain fatty acids. Enzyme and Microbial Technology, v. 13, p. 544 - 546, 1991.
64. SHIMADA, Y. SUGIHARA, A.; NAGÃO, T; TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* lipase by long chain fatty acids. Journal of Fermentation and Bioengineering v 74, n.2, p. 77- 80, 1992.

65. SOMKUTI, G. A.; BABEL F. J.; SONKUT, A. C. Lipase of *Mucor pusillus*
Applied Microbiology, v.17 , n.4, p. 606 - 610, 1969.
66. SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. A novel *Geotrichum candidum* lipase with some preference for the 2 - position a triglyceride molecule. Applied Microbiology Biothechnology, v. 35, p. 738 - 740, 1991.
67. SUGIHARA, A.; TADAAKI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermoestable lipase from *Baccillus sp.* . Journal of Biochemistry, v.109, p.211- 216, 1991.
- 68.SUGIURA, M. ISOBE, M. Studies on the Lipase of *Cromobacterium viscosum*. II Purification of a low molecular weight lipase and enzymatic properties. Biochimica et Biophysica Acta, v. 341, p. 195 - 200, 1974.
69. SUGIURA, M.; OIKAWA, T.; HIRANO, K.; INUKAI, T. Purification , cristallization and properties of triacylglycerol lipases from *Pseudomonas fluorences*. Biochimica et Biophysica Acta ,v. 341, p. 353- 8, 1977.
70. TALON, R.; PAPON, M. BAUCHART, O.; DUBOISE, F.; MENTEL, M.C. Lipolytic activity of *Brochotrix thermosphacta* on natural triglycerides. Letters in Applied Microbiology, v. 14, p. 153 - 157, 1992.
71. TORNQVIST, H.; BELFRAGE, R. Purification and some properties of a monoacylglycerol hidrolyzing enzyme of rat adipose tissue. Journal of Biological Chemistry, v. 251, n. 3, p. 813 - 819,1976.
72. TROLLER, J.A.; BOZEMAN, M.A. Isolation and characterization of *Staphylococcal* lipase. Applied Microbiology, v. 20, n.3, p. 480-484, 1970.
73. 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.
74. TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; FUKUMOTO, J.; OKOMOTO, Y. Induced formation of lipase by *Geotrichum candidum* Link. Agricultural and Biological Chemistry, v. 37, n. 4, p. 837 - 842, 1973.
75. TSUJISAKA, Y.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Purification, crystalization and properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link . Agricultural and Biological Chemistry, v. 37, n. 6, p. 14557 - 1464, 1973.

76. TYSKI, S.; HRYNIEWICZ, W.; JELJASZEWICZ, J. Purification and some properties of the Staphylococcal extracellular lipase. Biochimica et Biophysica Acta, v.749, p. 312- 317, 1983.
77. ZALMOST, B.L.; NIELSEN , H.K.; STARNES, R.L. Thermoestables enzymes for industrial application. Journal of Industrial Microbiology, v.8, p. 71- 82, 1991.
78. WATANABE, N.; OTA, Y. ; MINODA, Y.; YAMADA, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agricultural and Biological Chemistry, v. 41, n.8, p. 1353 - 1358, 1977.
79. YAMAGUCHI, T.; MURAYA, N.; ISOBE, M.; SUGIURA, M. Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. Agricultural and Biological Chemistry,v. 37, n. 5, p. 990 - 1005, 1973.
80. YAMAGUCHI, S.; MASE, T. Purification and characterization of monoacylglycerol lipase and diacylglycerol lipase isolated from *Penicillium camemberti* U- 150. Applied and Microbiology Biotechnology, v. 34, p. 720 - 725, 1991.
81. YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. Purification and some properties of a castor oil hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. Agricultural and Biological Chemistry, v. 52, n.12, p. 3015 - 3021, 1988.