

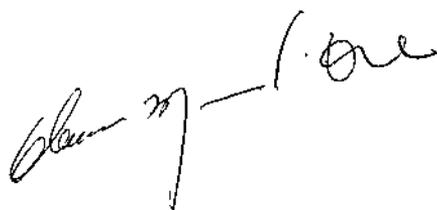
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E  
CARACTERIZAÇÃO  
DE LIPASE DE *ASPERGILLUS sp***

PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Marjorie C. Costa e Aprovada pela Comissão Julgadora em 31.05.96

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



*Marjorie Carelli Costa*  
*Eng. de Alimentos*

*Prof. Dr. Gláucia M. Pastore*  
*Orientadora*

1996

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	1/10/1996
V.	C823p
P.	27986
F.º	667/96
C.	<input type="checkbox"/>
D.	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/07/96
N.º CPD	

CM-00085439-5

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

C823p

Costa, Marjorie Carelli

Produção, purificação e caracterização de lipase de *Aspergillus sp*  
/ Marjorie Carelli Costa. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996

Orientador : Gláucia Maria Pastore.

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

1. Lipase. 2. *Aspergillus sp*. 3. Lipase - Produção. 4. Lipase -  
Purificação. 5. Lipase - Caracterização. I. Pastore, Gláucia Maria.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

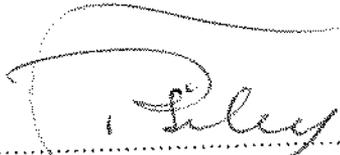
**BANCA EXAMINADORA**



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



Prof. Dr. Yon Kun Park  
(Membro)



Prof. Dr. Roberto da Silva  
(Membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(Membro)

Campinas, de maio de 1996.

*Com eterna gratidão,*

*Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos,  
cujo inestimável apoio, tornou possível a sua realização,  
e em especial ao Kiko, pelo carinho e dedicação sempre  
presentes.*

*As palavras dos sábios são como agulhões, e como pregos bem  
fixados as sentenças coligidas, dadas pelo único pastor.*

*Eccles. 12:11*

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Gláucia Maria Pastore, pela amizade e pelo seu sólido suporte técnico de todos esses anos.

Ao Prof. Dr Yong Kun Park e à profª Drª Hélia Harumi Sato, pela colaboração e valiosos ensinamentos prestados.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva pelas correções e sugestões oferecidas.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, Diretor da faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA, pelo incentivo e dedicação, em especial a Roseli e Alêssandra.

Ao Pessoal das secretárias de pós graduação e do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA, pela preciosa atenção.

Ao inestimável apoio dos amigos Homero, Natália e Zizi.

Aos funcionários da biblioteca da FEA pela cooperação dispensada.

Ao conselho Nacional de pesquisa ( CNPQ) pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

## ÍNDICE GERAL

	<b>pág</b>
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	xiii
SUMMARY .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
3.1 Materiais	
3.1.1 Reagentes e Materiais Específicos .....	26
3.1.2 Equipamentos .....	27
3.2 Métodos	
3.2.1 Isolamento de Microrganismos .....	28
3.2.2 Seleção de Fungos Produtores de Lipase .....	28
3.2.2.1 Fermentação Semi-sólida .....	28
3.2.3 Determinação da Atividade Lipolítica .....	29

3.2.3.1	Determinação da Atividade Enzimática com Substrato Óleo de Oliva .....	29
3.2.3.2	Determinação da Atividade Enzimática com Substrato Gordura de Côco .....	29
3.2.3.3	Determinação da Atividade Enzimática com Substrato Gordura de leite de Cabra .....	30
3.2.3.4	Determinação da Atividade Enzimática com Substrato <i>p</i> -Nitrofenil-Laurato (PNPL) .....	31
3.2.4	Produção de Lipase pela Linhagem de <i>Aspergillus sp</i>	
3.2.4.1	Produção de Lipase por Fermentação semi-sólida pela Linhagem de <i>Aspergillus sp</i> .....	31
3.2.4.2	Produção de Lipase pela Linhagem de <i>Aspergillus sp</i> por Fermentação Líquida .....	32
3.2.5	Estudo dos Parâmetros para Produção de Lipase por Fermentação semi-sólida	
3.2.5.1	Estudo da Composição do meio semi-sólido	33
3.2.5.2	Efeito da Proporção entre água e Farelo de Trigo no meio de crescimento na Produção da Enzima.....	34
3.2.5.3	Estudo do efeito do tempo de incubação na produção de lipase. ....	34
3.2.5.4	Estudo do efeito da temperatura de incubação na produção de lipase .....	35

3.2.6	Caracterização bioquímica da lipase bruta produzida pelas linhagens de <i>Aspergillus sp</i>	
3.2.6.1	Efeito do pH na atividade enzimática .....	35
3.2.6.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima .....	36
3.2.6.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima.....	36
3.2.6.4	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima .....	36
3.2.7	Hidrólise de glicérides pela lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> .....	36
3.2.8	Cromatografia em Camada Delgada ( TLC ) dos produtos de hidrólise por ação de lipase de <i>Aspergillus sp</i> .....	37
3.2.9	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( HPLC ) dos produtos de hidrólise de glicérides pela lipase	38
3.2.10	Identificação das linhagens produtoras de lipase ..	38
3.2.11	Estudo da especificidade da enzima bruta .....	38
3.2.12	Determinação de carboidratos totais presentes na lipase .....	39
3.2.13	Determinação do número de saponificação .....	39
3.2.14	Estudo da composição de meio para fermentação líquida .....	40
3.2.14.1	Efeito da presença de óleos e gorduras como indutores na produção de lipase por fermentação líquida .....	41

3.2.15	Purificação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068	
3.2.15.1	Fracionamento com sulfato de amônio .....	42
3.2.15.2	Cromatografia em coluna de DEAE Celulose .....	42
3.2.16	Dosagem de proteína pelo método de Lowry .....	43
3.2.17	Caracterização Bioquímica da lipase parcialmente purificada linhagem nº 1068 utilizando substrato PNPL	
3.2.17.1	Efeito do pH na atividade da enzima .....	43
3.2.17.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima ....	44
3.2.17.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima .....	44
3.2.17.4	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima .....	44
3.2.17.5	Influência da concentração de substrato na atividade da enzima .....	45
3.2.18	Estudo da ação de esterificação pela lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> .....	45

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1	Isolamento e seleção de microrganismos	
4.1.1	Seleção preliminar de microrganismos produtores de lipase .....	46
4.1.2	Seleção dos microrganismos melhores produtores de lipase .....	47
4.2	Identificação das linhagens produtoras de lipase .....	48
4.3	Produção de lipase pelas linhagens de <i>Aspergillus sp</i> .....	51

4.3.1	Efeito da proporção entre água e farelo de trigo na produção da enzima por fermentação semi-sólida .....	52
4.3.2	Efeito do tempo de incubação para produção de lipase por fermentação semi-sólida .....	54
4.3.3	Estudo do Efeito da temperatura de incubação na produção de lipase por fermentação semi-sólida .....	56
4.4	Caracterização bioquímica das lipases brutas produzidas pelas linhagens de <i>Aspergillus sp</i> n° 1068 e 1099	
4.4.1	Efeito do pH na atividade das enzimas .....	58
4.4.2	Efeito do pH na estabilidade das enzimas .....	61
4.4.3	Efeito da temperatura na atividade das enzimas .....	63
4.4.4	Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas .	65
4.5	Estudo de composição de meio para fermentação líquida .....	67
4.5.1	Efeito da presença de óleos e gorduras como indutores na produção de lipase .....	69
4.6	Produção e purificação parcial de lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068	
4.6.1	Produção da lipase .....	72
4.6.2	Purificação da lipase .....	72
4.7	Caracterização da lipase parcialmente purificada linhagem n° 1068 utilizando substrato PNPL	
4.7.1	Efeito do pH na atividade da enzima .....	77

4.7.2	Efeito do pH na estabilidade da enzima .....	78
4.7.3	Efeito da temperatura na atividade da enzima .....	79
4.7.4	Estabilidade térmica da enzima .....	80
4.7.5	Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática .....	81
4.7.6	Hidrólise de glicérides pela lipase de <i>Aspergillus sp</i> .....	83
4.7.6.1	Estudo da especificidade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	91
4.8	Determinação de carboidratos totais presentes na lipase .....	93
4.9	Estudo da ação de esterificação pela lipase de <i>Aspergillus sp</i> .....	93
5.	CONCLUSÕES .....	98
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1		
	Seleção preliminar de microrganismos para produção de lipase ....	46
Tabela 1A		
	Seleção do meio de cultivo para produção de lipase por <i>Aspergillus</i> <i>sp.</i> .....	51
Tabela 2		
	Purificação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Figura 1

1A) Fotomicrografia da linhagem nº 1068 de <i>Aspergillus sp</i> .....	49
1B) Fotomicrografia da linhagem nº 1099 de <i>Aspergillus sp</i> .....	50

### Figura 2

2A) Efeito da proporção entre água e farelo de trigo no meio de crescimento na produção da enzima de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068.....	53
2B) Efeito da proporção entre água e farelo de trigo no meio de crescimento na produção da enzima de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099.....	53

### Figura 3

3A) Efeito do tempo de incubação na produção de lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	55
3B) Efeito do tempo de incubação na produção de lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	55

### Figura 4

4A) Efeito da temperatura de incubação na produção da enzima de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068.....	57
4B) Efeito da temperatura de incubação na produção da enzima de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	57

Figura 5

5A) Efeito do pH na atividade de lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	60
5B) Efeito do pH na atividade de lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	60

Figura 6

6A) Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	62
6B) Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	62

Figura 7

7A) Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	64
7B) Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	64

Figura 8

8A) Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	66
8B) Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099 .....	66

Figura 9		
	Composição de meios para fermentação líquida, linhagem nº1068 .	69
Figura 10		
	10A) Efeito da presença de óleos vegetais no meio de fermentação líquida na produção de lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 ..	71
	10B) Efeito da presença de óleos vegetais no meio de fermentação líquida na produção de lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1099	71
Figura 11		
	Fluxograma de produção e purificação de lipase de <i>Aspergillus sp</i>	73
Figura 12		
	Cromatografia de lipase de <i>Aspergillus sp</i> em coluna de DEAE-Celulose .....	75
Figura 13		
	Efeito do pH na atividade da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	78
Figura 14		
	Efeito do pH na estabilidade da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068 .....	79

Figura 15

Efeito da temperatura na atividade da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068 .....	80
--	----

Figura 16

Efeito da temperatura na estabilidade da lipase parcialmente purificada de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068 .....	81
---	----

Figura 17

17A) Efeito da concentração do substrato <i>p</i> -nitrofenil-laurato na atividade de lipase Fração I .....	82
17B) Efeito da concentração do substrato <i>p</i> -nitrofenil-laurato na atividade de lipase Fração II .....	83

Figura 18

18A) Ação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068 sobre triglicerídeos .....	84
18B) Ação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1099 sobre triglicerídeos .....	85
18C) Efeito do tempo de reação da hidrólise enzimática por ação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068 .....	86
18D) Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos de hidrólise de gordura de côco por ação da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem n° 1068 .....	88

18E) Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos de hidrólise de óleo de oliva por ação da lipase bruta de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº 1068.	90
---	----

Figura 19

Ação da lipase de <i>Aspergillus sp</i> linhagem nº1068 sobre os substratos trioleína e monoleína	92
---	----

Figura 20

20A) Composição percentual dos glicerídeos formados por esterificação enzimática.....	94
20B) Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos de esterificação.....	96

## RESUMO

Seissentas e oitenta e nove linhagens de fungos foram isoladas de amostras de diversas regiões do Brasil, e testadas quanto à capacidade de hidrolisarem glicerídeos, através da ação de lipase extracelular.

Destas linhagens quatro foram pré-selecionadas como produtoras de lipase. Foram encontradas duas linhagens identificadas como *Aspergillus sp* que apresentaram alta produção de lipase em meio de cultivo composto de farelo de trigo e água.

A lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1099, hidrolisa preferencialmente gordura de leite de cabra e não apresenta afinidade pelo substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato.

A lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068 hidrolisa preferencialmete gordura de côco, tem pequena atividade contra óleo de oliva e apresenta afinidade pelo substrato *p*-nitrofenil-laurato. Devido à sua maior atividade lipolítica, esta enzima foi selecionada dentre as duas para o estudo de purificação enzimática.

Esta lipase foi parcialmente purificada através de fracionamento com sulfato de amônio e coluna de DEAE-Celulose obtendo-se duas frações. As frações obtidas apresentaram o mesmo perfil bioquímico quanto ao pH e à temperatura ótima de ação enzimática.

A Reação de esterificação entre ácido oleico e glicerol pela lipase de *Aspergillus sp* n°1068 foi examinada e verificou-se que a enzima esterifica o ácido oleico e glicerol, produzindo mono, di e triglicerídeos.

## SUMMARY

The screening of lipase producing filamentous fungi was performed including 689 strains of microorganisms which were isolated from samples of the several regions in Brazil.

It was found that four strains produced high activity of extracellular lipase. Two of them produced higher activity of lipase. These strains were identified as *Aspergillus sp.*

The lipase from *Aspergillus sp* was produced by solid state fermentation in medium containing wheat bran and water.

The lipase from *Aspergillus sp* strains n°1099 hydrolysed preferentially she-goat milk fat and did not hydrolyse the synthetic substrate *p*-nitrophenil-laurate.

The lipase from *Aspergillus sp* strains n°1068 hydrolysed preferentially coconut oil and olive oil and hydrolysed the synthetic substrate *p*-nitrophenil-laurate. This enzyme showed the highest lipolytic activity. For this reason it was selected to be purified on column chromatography.

This lipase was partly purified by fractionation with ammonium sulfate and DEAE-cellulose column. Two fractions were obtained in the end of the purification process. Both showed the same biochemical profile regarding pH and temperature of activity.

Enzymatic esterification using glycerol and oleic acid by lipase from *Aspergillus sp* strains n°1068 was also examined. It was found that the enzyme esterified the oleic acid and glycerol and that it produces monoglycerides, diglycerides and triglycerides.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse pelas enzimas tem aumentado com o desenvolvimento dos processos biotecnológicos. Aquelas de origem microbiana vêm suplantando em alguns casos as de origem vegetal ou animal. Isto se deve ao fato de que elas apresentam a grande vantagem de exigirem curto tempo de produção, podendo ser produzidas em qualquer época do ano, utilizando, geralmente, substratos de baixo custo, além de demanda de espaço relativamente pequeno para o processo fermentativo.

Lipases ( E.C 3.1.1.3 ) são um grupo de enzimas que podem catalisar a hidrólise de glicerídeos, produzindo ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol; e em condições onde o nível de água é restrito, realizam a reação inversa, produzindo glicerídeos a partir de glicerol e ácidos graxos.

Durante as duas últimas décadas, as pesquisas sobre lipase fúngica avançaram bastante. Um grande número de espécies de fungos foram descobertos como eficientes produtores de lipases e estudados exaustivamente sob o ponto de vista industrial e acadêmico.

Na indústria alimentícia, as lipases fúngicas, realizam importante papel na produção de “flavors” em vários tipos de queijos maturados sob condições controladas.

O presente trabalho teve como objetivo, o isolamento e seleção de fungos produtores de lipase, a produção e o estudo das características bioquímicas da enzima.

Foram selecionadas duas linhagens produtoras de lipase, identificadas como *Aspergillus sp.* O meio semi-sólido apresentou-se como mais favorável para produção da enzima.

A linhagem nº1068 de *Aspergillus sp.*, pelas características apresentadas durante o estudo, foi escolhida para produção de lipase, a qual foi caracterizada quanto às suas propriedades bioquímicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SHIPE, em 1951 (54), verificou a especificidade relativa da ação de lipases produzidas por *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger*. Estas lipases foram estudadas por terem demonstrado marcada diferença na sua especificidade de ação. As enzimas foram produzidas em meio de cultura sem óleo ou gordura para não induzir a produção de lipases com especificidade pré determinada. Para produção de lipase de *Penicillium roqueforti* foi utilizado o meio composto de peptona, extrato de carne e glucose (pH 7,0). As lipases estudadas apresentaram diferença sensível na taxa de hidrólise dos substratos tributirina, tricaprilina e trioleína. A lipase de *Aspergillus niger* hidrolisou mais eficientemente em ordem decrescente tricaprilina, trioleína e tributirina. A lipase de *Penicillium roqueforti* hidrolisou mais eficientemente em ordem decrescente tributirina, tricaprilina e trioleína. O pH ótimo da lipase de *Penicillium roqueforti* foi de 5,0 e o pH ótimo da lipase de *Aspergillus niger* foi de 5,5 e a temperatura ótima de 30 a 35°C para lipase de *Penicillium roqueforti*, e entre 35 a 40°C para a lipase de *Aspergillus niger*, sendo que a adição de cloreto de cálcio acelerou a ação de ambas lipases.

MORRIS & JEZESKI, em 1953 (36), estudaram algumas características do sistema de lipases de *Penicillium roqueforti*, pois a hidrólise da gordura do queijo por este microrganismo produz o aroma e sabor típico do "Blue Cheese" após maturação. Os autores utilizaram preparações do micélio de *Penicillium* e do filtrado do meio de cultura, atuando sobre gordura de leite e tributirina. A temperatura ótima quando usaram o micélio e o filtrado do meio de cultura sobre tributirina e gordura de manteiga foi entre 30 e 32°C. Os valores de pH ótimos, foram os seguintes: filtrado do meio de cultura pH 7,0 e 7,8 sobre tributirina e 6,5 a 6,8 sobre gordura de manteiga, preparação micelial, pH 6,0 a

6,7 sobre tributirina e 7,0 a 7,2 sobre gordura de manteiga. As enzimas presentes nestas duas preparações mostraram muito maior especificidade relativa para triglicerídeos do que para etil ésteres. Havia uma taxa de hidrólise maior do sistema agindo sobre tributirina do que outro substrato utilizado. O sistema de lipase apresentou um terço de atividade em gordura de manteiga quando comparado com tributirina. Diferenças nas características das duas preparações enzimáticas constituem confirmação adicional que poderia haver mais de uma lipase produzida por este fungo. Dentre os substratos estudados a taxa de hidrólise foi maior quando se utilizou tributirina, o que sugere que este sistema de lipases tem especificidade para ésteres contendo ácidos graxos de 4 a 8 átomos de carbono.

HARPER & GOULD, em 1954 (13), estudaram e compararam as características de vários sistemas de preparações enzimáticas com relação a atividade a várias temperaturas, pH e concentrações de substratos, e avaliaram qual desses poderiam ser utilizadas na manufatura de queijos itálicos, pelo fato de contribuírem para o desenvolvimento de sabor e aroma em certos queijos como provolone e romano. Enzimas provenientes de bezerro, cabrito e cordeiro foram utilizadas para estudo, que atuaram em gordura de leite fresco. Todas as preparações enzimáticas foram conduzidas a pH 5,3, permanecendo por 5 horas em incubação. a temperatura ótima de atividade lipolítica foi entre 29 e 35°C para as preparações. Os resultados de pH e concentração de substrato, revelaram que cada uma das preparações contêm um sistema de lipase múltipla. As lipases de bezerro apresentaram pH ótimo de 5,3, 6,1, e 7,5, as lipases de cabrito entre 5 e 6; e a preparação de cordeiro exibiu duas lipases com pH ótimo de 5,9 e 6,6.

HARPER & LONG, em 1956 (15) , analisaram a influência de ácidos graxos e aminoácidos livres no sabor de queijo provolone comercial, verificaram que o tipo de ácido graxo produzido dependia do tipo de lipase

utilizada na sua produção. A intensidade do sabor desejável está correlacionada com a concentração de ácido butírico produzido e ácido glutâmico, indicando que na composição do sabor deve-se considerar os produtos de degradação, tanto de gordura como de proteína simultaneamente. Foi observada a existência de uma correlação entre a concentração de ácido butírico livre, ácido glutâmico livre e a intensidade de sabor, sendo que a proporção de 1:2 de ácido butírico para ácido glutâmico é ideal para obtenção do sabor desejável neste tipo de queijo.

JENSEN *et alii*, em 1960 (24), estudaram a especificidade da lipase presente no leite. Para a análise de especificidade foi necessário detectar o conteúdo de 1- monoglicerídeo e 2- monoglicerídeo da gordura de leite lipolizado por um período curto ( 2 horas) antes que ocorresse isomerização. Os resultados obtidos indicam que a lipase presente no leite de vaca apresenta especificidade para hidrólise da ligação éster do carbono primário, assim como a lipase pancreática.

ALFORD & PIERCE, em 1961 (2), mediram a atividade lipolítica de linhagens como *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roqueforti* e *Penicillium sp* em emulsões de óleo de côco, óleo de milho e toucinho. As lipases destes microrganismos mostraram ter considerável atividade a temperaturas abaixo de 0 °C. A taxa de lipólise em substratos congelados foi diretamente relacionada com o nível de insaturação dos mesmos. Os autores observaram que o óleo de côco foi o mais rapidamente atacado dentre os três substratos para todas as lipases, com exceção da lipase de *Geotrichum candidum* que foi consideravelmente mais específica para ácido oleico e ácido linoleico. Os autores encontraram diferenças básicas entre as lipases microbianas de diferentes origens, e que o tipo de ácido graxo bem como a sua posição no triglicerídeo, determina a atividade da lipase microbiana. Em comun estas enzimas foram ativas em temperaturas baixas.

FUKUMOTO *et alii*, em 1963 (11), selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* que produziu grande quantidade de lipase quando cresceu em meio de farelo de trigo (Processo Koji). O meio de reação para atividade de lipase continha duas gramas do substrato óleo de oliva, 5 mL de tampão acetato pH 5,6 0,1 M, 0,1 mL de cloreto de cálcio 1 M e 1 mL da solução da enzima. A enzima foi purificada com sulfato de amônio e acetona, seguido por tratamento ácido, precipitação por acrinol e cromatografia de troca iônica, obtendo a forma cristalina da enzima. A atividade lipolítica não diminuiu mediante exaustiva diálise em água, sugerindo a ausência de um cofator no dialisado. A enzima hidrolisou quase que completamente o óleo de oliva, possuindo ótimo de pH e temperatura em 5,6 e 25°C respectivamente. A enzima apresentou estabilidade na faixa de pH entre 2,2 e 6,8 e não resistiu à temperatura acima de 50°C por 15 minutos.

ALFORD *et alii*, em 1964 (3), analisaram a característica de especificidade de diferentes lipases microbianas em gorduras naturais e triglicerídeos sintéticos. Foi observada a habilidade das lipases de *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus flavus* de hidrolisarem a posição 2 do triglicerídeo na mesma taxa que na posição 1, sugerindo um ataque não específico na ligação éster. A lipase de *Pseudomonas fragi*, assim como a lipase pancreática atacam mono e diglicerídeos em taxas muito mais baixas que quando atuam sobre triglicerídeos. A lipase produzida por *Geotrichum candidum* apresenta um alto grau de especificidade para ácido graxo insaturado, independentemente da sua posição no triglicerídeo.

LAWRENCE, em 1967 (30), descreveu as classes de enzimas lipolíticas relatando que o termo lipase comumente utilizado por microbiologistas não é muito diferente do termo esterase, que significa enzimas que hidrolisam somente ligação éster, e a linha divisória entre lipases e esterases não é bem

definida. Lipase foi definida de acordo com a União Internacional de Bioquímica como o glicerol éster hidrolase ( E. C. 3. 1. 1. 3 ) em 1961. O autor relata que alguns microbiologistas consideram que as lipases microbianas podem hidrolisar ésteres de glicerol emulsificados, enquanto que esterases hidrolisam substratos perfeitamente solúveis. Foi enfatizado que apesar da forma na qual pode ser feita a classificação das esterases e lipases, nenhuma propriedade única permite a distinção geral entre esterases e lipases microbianas. A definição mais satisfatória, mas puramente arbitrária parece ser a que lipases atacam triglicerídeos insolúveis simplesmente porque são os substratos mais comuns. Os autores afirmaram que esta definição deverá ser certamente alterada quando os substratos fisiológicos destas enzimas forem determinados.

LAWRENCE *et alii*, em 1967 (31), descreveram os métodos utilizados para estimar a atividade de lipase e os fatores que afetam a velocidade de hidrólise. A atividade hidrolítica da lipase depende da estrutura do ácido graxo e do álcool no substrato. A diferença na extensão da hidrólise de vários triglicerídeos sintéticos e naturais pode ser atribuída somente à sua constituição de ácido graxos. A especificidade das lipases de alguns microrganismos parece estar relacionada à posição do ácido graxo no triglicerídeo e em outros casos, ao próprio ácido graxo e seu grau de insaturação.

Nos estudos de produção de lipase por *Mucor pusillus*, realizados por SOMKUTTI & BABEL, em 1968 (55), 2 linhagens foram examinadas por sua capacidade de sintetizar lipase em um meio complexo usado na produção de protease de coágulo de leite. A atividade lipolítica de ambas linhagens, alcançou o máximo após 6 dias de incubação em condições de fermentação submersa a 35°C. A lipase hidrolisou gordura de manteiga e óleos vegetais tão bem quanto os triglicerídeos sintéticos selecionados. Cerca de 50% de atividade lipolítica foi destruída após 45 minutos a 58°C.

SOMKUTI & BABEL, em 1969 (56), estudaram algumas propriedades da lipase produzida por *Mucor pusillus* e compararam com as de outras lipases fúngicas. A atividade máxima da lipase foi observada na faixa de pH 5,0 a 5,5 a 50° C , quando trioctaneína e óleo de oliva foram usados como substratos. A enzima mostrou atividade de esterase porque hidrolisou todos metil-ésteres testados. Para a atividade de esterase, a enzima deve hidrolisar ácidos graxos de no mínimo 6 carbonos. Tanto a lipase, como a esterase não foram afetadas por grupos tióis, agentes quelantes e compostos redutores. A enzima permaneceu estável durante 30 dias a -10°C.

EITENMILLER *et alli*, em 1970 (9), estudaram os fatores que afetam a produção, purificação e atividade de lipase de *Penicillium roqueforti*. A linhagem de *Penicillium roqueforti* produziu máxima quantidade de lipase quando cresceu em meio contendo 0,5% casitone, 1% caldo proflor pH 5,5 a 27°C. Estes resultados indicaram que a lipase de *Penicillium roqueforti* requereu uma fonte orgânica complexa de nitrogênio para máxima produção de lipase. A adição de óleo de manteiga, óleo de milho e óleo de oliva ao meio de crescimento inibiu a produção da lipase. Para caracterização da lipase uma preparação parcialmente purificada foi obtida por filtração com Celite, seguindo de precipitação com sulfato de amônio. Uma fração de lipase foi obtida com a maior atividade específica entre 30 a 50% de saturação com sulfato de amônio. A fração lipolítica parcialmente purificada de *Penicillium roqueforti* tem um pH e temperatura ótima de 8,0 e 37°C respectivamente. A maior atividade lipolítica ocorreu com 5% de emulsão de manteiga, cloridrato de manganês e cloridrato de magnésio. A enzima se mostrou termolábil, sendo completamente inativada quando tratada a 50°C por 10 minutos . A lipase de *Penicillium roqueforti* hidrolisou tributirina, tricaprilina, tricaprina, tripropionina e trioleína em ordem decrescente.

IWAI *et alli*, em 1970 (23), em seus estudos sobre lipases fúngicas, verificaram os efeitos das formas iônicas do ferro, sobre a lipase de *Aspergillus niger*. A lipase purificada e cristalizada, foi obtida de extrato aquoso obtido a partir de farelo de trigo (Processo Koji). No decorrer da purificação, os autores perceberam que frequentemente ocorria uma diminuição na atividade da lipase durante a extração da enzima e diálise contra água destilada. A causa desta inativação foi investigada e foi encontrado que o fenômeno se baseava na forte inibição da atividade da lipase por pequenas quantidades de íons ferroso e férrico na água de diálise. A adição de íons do ferro durante a reação, não causou inibição, enquanto a adição destes na mesma concentração antes de começar a reação, mostrou um forte efeito inibitório. Estes resultados sugerem que a inibição da lipase por íons do ferro é evitada pela presença de ácidos graxos, que teriam sua concentração aumentada conforme a reação de hidrólise prosseguisse. Os autores concluíram também que há dois tipos de inativação: reversível e irreversível. O primeiro tipo de inativação seria pelo contato da lipase com pequenas quantidades de ferro, por curto período de tempo e o segundo tipo é o contato da lipase com grandes quantidades de íons ferro por longo período de tempo. Uma maior quantidade de ferro foi requerida para a inibição da esterificação enzimática do que para para ação hidrolítica.

TSUJISAKA *et alii*, em 1972 (61), fizeram um estudo comparativo de algumas propriedades de lipases fúngicas. *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* foram selecionados como produtores de lipase. *Aspergillus niger* produziu lipase especialmente em meio sólido, composto de farelo de trigo e  $\text{CaCO}_3$ , enquanto os outros 3 fungos produziram grande quantidade de lipase em meio líquido. Este meio tinha como característica alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono. Para *Penicillium cyclopium*, o meio de cultura mais adequado continha

farelo de arroz e água de maceração de milho. Segundo os autores todas as lipases produzidas podem ser classificadas na categoria de glicerol éster hidrolase E.C. 3.1.1.3 por sua ação catalítica. Todas as enzimas foram ativadas na presença de íons cálcio e severamente inativadas por íons ferrosos e férricos . Das observações feitas sobre a ativação da lipase de *Aspergillus niger*, foi verificado que esta característica não ocorre no início da reação enzimática sobre o óleo de oliva, porém após o acúmulo de certa quantidade de ácido oleico, a ativação é induzida e a reação é acelerada. O fenômeno da ativação foi verificado ocorrer somente no caso de hidrólise de triglicerídeo compostos de ácidos graxos de cadeia longa. Portanto a ativação parece depender do estado de emulsificação da mistura de reação pela formação de sais de cálcio com ácidos graxos livres. A ação de síntese pelas lipases na reação de ácidos graxos e glicerol, foi verificada produzindo mono, di e triglicerídeos. As lipases de *Rhizopus delemar* e *Aspergillus niger* demonstraram ter larga especificidade para vários ácidos graxos e grande atividade de síntese em relação as outras duas lipases.

HOOVER *et alii*, em 1973 (18) , isolaram uma lipase de *Aspergillus flavus* que hidrolisou óleo de côco. A enzima foi purificada 109 vezes por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia utilizando DEAE-Celulose e Sephadex G-200. O pH ótimo para a atividade da enzima, foi de 6,2. Os ácidos graxos dos triglicerídeos de cadeia curta foram mais rapidamente hidrolisados, enquanto hidrólise de triestearina não foi detectada sob as condições do ensaio. Os produtos da hidrólise enzimática em óleo de côco, foram analisados por cromatografia de camada delgada e gasosa e estavam presentes os seguintes ácidos graxos: oleico, palmítico, mirístico, láurico, caprílico, capróico e cáprico.

NAGAOKA & YAMADA, em 1973 (38), purificaram lipases de *Mucor lipolyticus* Aac-0102 e estudaram algumas propriedades da enzima purificada. A fração ( F-3 ) com atividade hidrolítica em óleo de oliva foi

separada em 2 frações F-3A e F-3B por cromatografia em coluna de CM-Sephadex C-50. O pH ótimo para hidrólise do óleo de oliva para F-3A foi 9,0 enquanto para F-3B foi 8,0. O ponto isoelétrico foi determinado por eletroforese e para F-3A foi em pH 9,0 e para F-3B foi em 10,2. F-3A apresentou fraca atividade frente a substratos como tricaproína, tributirina e tripropionina, enquanto F-3B mostrou atividade alta para tributirina e tricaproína.

IWAI & TSUJISAKA, em 1974 (21), estudaram a purificação e as propriedades de 3 tipos de lipases de *Rhizopus delemar*. Os estudos foram conduzidos no sentido de verificar se estas lipases produzidas por um microrganismo, eram diferentes entre si. As 3 lipases ( A, B e C ) foram separadas e purificadas em coluna. O pH ótimo para os 3 tipos de lipase foi 5,6. Foi observado que a temperatura ótima para lipase A foi 30°C e para as lipases B e C a temperatura foi 35°C. A lipase A é estável em torno de pH 3,0 a 8,0 enquanto as lipases B e C foram estáveis em torno de pH 4,0 a 7,0. As lipases B e C purificadas, foram estáveis abaixo de 45°C, enquanto que a lipase A foi estável até 60°C. Foi concluído pelos autores que a lipase A é diferente de B e C na sua estrutura proteica.

Algumas propriedades da lipase extracelular de *Rhizopus arrhizus* foram descritas por BENZONANA, em 1974 (5). A enzima quando purificada em coluna de AMBERLITE IRC 50 foi separada em dois picos ( lipase I e II ). A adição de 2mM de di-isopropilfluorfosfato (DFP) para o meio de incubação contendo lipase, interrompe a formação de lipase II. O autor concluiu desta forma que a lipase II é o resultado da degradação proteolítica da lipase I e não excretada pelo fungo como a lipase II. Os pesos moleculares das duas enzimas são dados como 40000 e 30000 para as lipases I e II respectivamente. Titulações de açúcares neutros sobre frações eluídas da coluna, mostram que a lipase I é rica em carboidratos, sendo que a lipase II não os apresenta. A lipase de *Rhizopus*

*arrhizus* mostrou a mesma especificidade posicional sobre triglicerídeos de cadeia longa como a lipase pancreática, rompendo a ligação éster das posições 1 e 3.

ISHIHARA *et alii*, em 1975 (18) purificaram e estudaram algumas propriedades de *Mucor javanicus*. A enzima purificada atacou não somente ligações éster do ácido graxo nas posições 1 e 3 do triglicerídeo, mas também apresentou atividade de fosfolipase A1, pois hidrolisou ligações éster na posição 1 da fosfatidilcolina. Ambas lipases produziram ácido oleico e 1,2(2,3) dioleoil glicerol como maior produto e 2- monooleil glicerol como produto menor. A lipase de *Mucor sp* tem especificidade posicional em relação as posições 1 e 3 do triglicerídeo. O pH ótimo para atividade lipolítica frente ao triglicerídeo foi aproximadamente 7,5 e de 8,5 para fosfatidilcolina. A lipase foi estável na faixa de pH 4,5 a 8,0 à temperatura de 6°C por 24 horas. A temperatura ótima de ação da lipase foi de 37°C, sendo rapidamente perdida à temperatura de 40°C .

OKUMURA *et alii*, em 1976 (45), isolaram lipases de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* Westing e demonstraram que as propriedades físico-químicas e especificidade quanto ao substrato destas lipases eram distintas umas das outras. Para o estudo de especificidade posicional dos 4 tipos de lipase, usaram trioleína, dioleína e manteiga de cacau como substratos. Os produtos de hidrólise foram extraídos com éter etílico e separados por cromatografia em camada delgada, e a análise da composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa. Pela ação destas enzimas sobre o substrato trioleína, foi concluído que lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* não hidrolisam a ligação éster na posição 2 do glicerídeo. Quando dioleína foi utilizada como substrato, estas duas hidrolisaram 1,3 dioleína em preferência à 1,2 (2,3) dioleína. As lipases de

*Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium* hidrolisaram todas as ligações éster do triglicerídeo, independente da sua posição no triglicerídeo.

TSUJISAKA *et alii*, em 1977 (62), determinaram as melhores condições para síntese de glicerídeos por 4 lipases microbianas. Foram examinadas as misturas de reações que consistiam de 4 mL de glicerol, 1 mL de água, 0,1 mL de solução de enzima e 0,1 g de ácido oleico. Nas primeiras horas de reação, 1-(3) monoleína e 1,3-dioleína foram detectadas como produtos de síntese pela ação das lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*; entretanto, após longo período de reação, (1,2),(2,3) dioleína e trioleína foram detectadas. Em contraste, 1 (2) e 2 monoleína, 1,2(2,3) e 1,3 dioleína e trioleína foram detectados como produtos de síntese pela ação das lipases de *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*.

PAL *et alii*, em 1978 (48), 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 7,0 num período de incubação de 96 horas. Dos açúcares testados, sacarose foi considerada a melhor fonte de carbono para produção de lipase por esta linhagem, na concentração de 1%. Sulfato de magnésio e sulfato ferroso na concentração de 0,04% e 0,1% respectivamente, representaram um papel importante na produção da lipase. Gordura de manteiga e óleo de oliva quando acrescentados ao meio de fermentação melhoraram o crescimento celular e a produção da enzima.

A Influência de diferentes triglicerídeos sobre a indução da lipase de *Mucor hiemalis* foi estudada por AKHTAR *et alii*, em 1980 (1). Os fungos cresceram em meio contendo peptona, minerais, glicose, óleo de oliva, gordura de côco e óleo de mostarda como fonte de carbono. Dos triglicerídeos testados, o

do óleo de oliva foi o melhor indutor de lipase . O pH ótimo de atividade foi 7,0. Os resultados mostraram que a lipase induzida pelo triglicerídeo do óleo de oliva não foi ativa para o mesmo triglicerídeo, nem foi a lipase inibida por ele. A lipase produzida foi mais ativa sobre o triglicerídeo de óleo de côco e sua especificidade não foi devido a melhor emulsificação deste óleo.

CHANDER *et alli*, em 1980 (6), estudaram os fatores que afetam a produção de lipase de *Aspergillus wentii*. O fungo foi cultivado por diferentes períodos de incubação (1 a 6 dias) e temperaturas ( 22, 30 e 37°C ). A produção máxima de lipase foi obtida quando o fungo cresceu a 30°C em 3 dias, em pH 6,0 quando utilizado 2,0% de peptona e 0,5% de glucose como fonte de carboidrato.

A síntese de lipase por *Aspergillus wentii*, foi estimulada ao nível de 46% e 64% com citrato de cálcio e sódio. Triglicerídeos sintéticos como tributirina, tricaproína, tricaprilina, tripropionina reduziram a produção de lipase em 24, 37, 42 e 32% respectivamente; enquanto manteiga e óleo de oliva causaram inibição da atividade de lipase em 53 e 63 % respectivamente.

OKUMURA *et alii*, em 1980 (46), purificaram e estudaram as propriedades da lipase de *Penicillium cyclopium* M1 e observaram que este microrganismo produz 2 tipos de enzimas lipolíticas. Uma das enzimas pareceu ser mais específica para glicerídeos parciais do que para triglicerídeos. Monoglicerídeos contendo ácidos graxos de cadeia média, especialmente monocaprilina, monocaprina, monolaurina e monoleína foram hidrolisados mais rapidamente do que triglicerídeos de mesma cadeia. A enzima foi reconhecida como uma hidrolase parcial devido a especificidade ao substrato. Quando esta enzima foi usada em conjunto com outra lipase atuando sobre triglicerídeo, o nível de hidrólise do triglicerídeo tornou-se extremamente alto.

OKUMURA *et alii*, em 1981 (47), estudaram o efeito da ação reversa na hidrólise de triglicerídeos. Foram utilizadas lipases purificadas de

*Aspergillus niger* NRLL, *Rhizopus delemar* ATCC, *Geotrichum Candidum* ATCC e *Penicillium cyclopium* ATCC. Os resultados indicaram que a lipase de *Rhizopus delemar* apresentou forte ação de esterificação durante a hidrólise, e não hidrolisou a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo. Os autores consideram, que esta característica pode ser responsável, pela lipase de *Rhizopus delemar* apresentar o menor grau de hidrólise dentre as quatro lipases estudadas. Embora a lipase de *Aspergillus niger* também não hidrolise a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo, a hidrólise procedeu gradualmente acima de 70%. Isto se deve porque a lipase de *Aspergillus niger* não é tão ativa na reação de esterificação. A lipase de *Geotrichum Candidum*, hidrolisou ligações éster em todas as posições do triglicerídeo, e apresentou a mais fraca ação de esterificação durante a hidrólise de trioleína entre as quatro lipases. Estes dados explicam a causa de *Geotrichum candidum* hidrolisar trioleína acima de 90% mais rapidamente do que as quatro lipases estudadas. A lipase de *Penicillium cyclopium* também hidrolisou todas as ligações éster do glicerídeo, assim como a lipase de *Geotrichum candidum*. Contudo, o nível de hidrólise foi bem menor que o de *Geotrichum candidum*. Foi explicado pelos autores que *Penicillium cyclopium* também apresenta ação de esterificação durante a hidrólise de trioleína.

Lipase produzida por *Aspergillus niger* foi testada quanto a capacidade de sintetizar ésteres de diversos álcoois e ácidos carboxílicos por OKUMURA *et alii*, em 1984 (44). A mistura de reação foi composta de 1,3 ácido tridecanedióico, 1,3 propanodiol e lipase. Foi verificado que após 24 horas de reação, quase todo o ácido livre tinha desaparecido. A enzima esterifica apenas álcoois primários .

LINFIELD *et alii*, em 1984 (33), estudaram a cinética da hidrólise em banha, óleo de côco e óleo de oliva, utilizando as lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*, como também a esterificação do ácido

oleico com glicerol. O óleo de oliva foi o substrato que apresentou melhor hidrólise. Os resultados da hidrólise com *Aspergillus niger* foram similares àqueles de *Candida rugosa*. Ambas lipases não são específicas e hidrolisam a posição 1 e 2 do triglicerídeo e são capazes de hidrolisar todos os três substratos em 72 horas. A temperatura de hidrólise em óleo de côco e oliva foram de 23 e 27°C, e em banha foi de 43°C. A lipase de *Aspergillus niger* foi completamente sensível ao calor, sendo inativada a 52°C. A lipase de *Rhizopus arrhizus* é específica e hidrolisou triglicerídeos mais vagarosamente do que as duas lipases citadas. Os resultados de esterificação do glicerol com ácido oleico foram os mesmos para lipase de *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*. A análise através da cromatografia em camada delgada após 6 semanas, apresentou 1,4% de monoglicerídeos, 19,8% de diglicerídeos, 43,6% de triglicerídeos e 35,3% de ácidos graxos.

POSORSKE, em 1984 (52), relatou as aplicações da lipase na indústria de óleos e gorduras, tendo verificado que as enzimas em geral tem vantagem no processo industrial, como por exemplo a especificidade, que permite o controle dos produtos a serem obtidos e também de controlar a síntese de produtos secundários não desejados, condições brandas de reação e redução do desperdício. A modificação enzimática de lipídeos tem sido usado na indústria, na área de desenvolvimento de sabor e aroma em queijos, assim como lipolisados de gordura de leite para adicionar em alimentos processados. Uma grande área de atuação das lipases é na síntese de ésteres. Apesar da reação de esterificação poder ser realizada quimicamente, a reação enzimática tem muitas vantagens, como por exemplo, de ser realizada a baixas temperaturas, e o tipo de especificidade da enzima. A lipase de *Rhizopus arrhizus* foi usada para esterificar ácidos graxos de cadeia longa e conseguiu-se 80% de esterificação em meio não aquoso. Outra área de aplicação é a interesterificação, onde o objetivo é a troca

de uma ácido graxo da molécula do triglicerídeo por outro ácido graxo presente no meio da reação. Como exemplo, a reação de interesterificação de trioleína com ácido palmítico. A lipase usada foi de *Candida cylindracea* e *Mucor miehei*. Os sucessos dos trabalhos indicam, segundo os autores, um grande caminho a ser investigado

HOFELMANN *et alli*, em 1985 (16) isolaram, purificaram e caracterizaram uma lipase de *Aspergillus niger*, utilizando uma técnica comercial para medida de atividade lipolítica. Para determinar a atividade de lipase, foi usado tributirina como substrato. A solução de enzima bruta, foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-trisacril M. Foram obtidas duas frações F1 e F2 com diferentes pesos moleculares que foram recromatografadas por filtração em gel com resina Sephadex G 50. Em seguida para retirada de impurezas, as frações foram novamente separadas sobre phenilsepharose CL-4B. Após estes procedimentos eles obtiveram as lipases I e II, com pontos isoelétricos de 4,0 e 3,5. As lipases apresentaram pesos moleculares de 31000 e 19000 daltons respectivamente. O conteúdo de carboidratos foram estimados em 6% e 9%. A lipase I apresentou alta taxa de hidrólise sobre ésteres C6-C12, enquanto a lipase II hidrolisou predominante ésteres de ácidos graxos de cadeia curta. As lipases I e II mostraram atividade máxima entre pH 5 e 6 e perderam sua atividade em pH 7-8. Tanto a lipase I, como a lipase II, foram estáveis à temperatura abaixo de 40°C, mas perderam 40 % de sua atividade após 10 minutos de incubação a 60°C e não resistiram a temperatura de 80°C.

OKUMURA & KINSELLA, em 1985 (43), estudaram a formação de metilcetonas por *Penicillium camemberti* em sistemas modelo. Os componentes do flavor no queijo tipo camemberti são metilcetonas, ácidos graxos, álcoois, ésteres derivados dos lipídeos, aminoácidos, produtos formados via atividade enzimática do fungo *Penicillium camemberti*. As metilcetonas são

os componentes em maior proporção responsáveis pelo sabor do queijo. Dentre estas, 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona são homólogos em maior proporção. Os autores verificaram que ao se adicionar lipase em um sistema de reação composto de leite homogeneizado diluído com tampão fosfato pH 6,8 e micélio de *Penicillium camemberti*, a produção de carbonila foi significativamente maior e isto pode ter refletido em uma maior concentração de ácido graxo.

Uma nova lipase de *Aspergillus oryzae* foi descoberta em 1986, por ARBIGE *et alii*, (4) pela sua capacidade em produzir aroma típico de queijo tipo cheddar, quando incubado em gordura de leite por 15 dias a 4°C. Preparações enzimáticas parcialmente purificadas desta linhagem, foram caracterizadas e contém tanto proteases como lipases, sendo que esta última fração demonstrou uma maior contribuição para o desenvolvimento de aroma. Como a maturação deste queijo para desenvolver as características de aroma, sabor e corpo desejados levam de três a nove meses, tem havido grande interesse em processos que visem a aceleração da maturação, o que possibilitaria grande economia à indústria queijeira. Segundo os autores, os ácidos graxos liberados pela lipase de *Aspergillus oryzae* são quase idênticos aos ácidos graxos liberados durante a maturação natural do queijo tipo cheddar. Esta lipase quando usada em conjunto com protease fúngica, pode produzir aroma e sabor de queijo cheddar de alta qualidade.

NAIR & BONE, em 1987 (40), estudaram a produção de lipase de *Aspergillus foetidus* em fermentadores e investigaram as condições ótimas de cultura em meio líquido e a utilização do microorganismo imobilizado em polímeros naturais como alginato de sódio e ágar. O meio de crescimento para produção máxima de lipase por *Aspergillus foetidus* apresentou 2,0% de óleo de oliva e 0,5% de sacarose. Na ausência de óleo de oliva no meio fermentativo, foi

observada baixa atividade da enzima. O pH inicial do meio é de 4,5 caindo para 2,5 com a produção de lipase pelo microrganismo. Foi obtida produção máxima da enzima com agitação de 500 rpm.

A imobilização em alginato de sódio e ágar não foi possível. Houve desintegração do alginato e ágar, sendo observado baixo nível de lipase produzida. Os autores levantaram a hipótese do microrganismo ter consumido estes polissacarídeos como fonte de nutrição para seu crescimento.

TAHOUN *et alii*, em 1987 (59), isolaram uma lipase intracelular de *Aspergillus niger*. A enzima foi purificada através de filtração em gel sobre coluna de Sephadex. A atividade lipolítica sobre triglicerídeos (C10-C18) foi determinada em pH 6,5 a 30°C por trinta minutos. Dos resultados obtidos da hidrólise de triglicerídeos de gordura de leite, os mono e diglicerídeos tiveram porcentagens de 9,5% e 13,8% respectivamente após 15 minutos de reação, enquanto a máxima produção de ácidos graxos livres foi detectada após 30 minutos. Quantidades iguais de 1,2 (2,3) e 1,3 diglicerídeos foram produzidos de triglicerídeos de óleo de oliva após 5 minutos, entretanto após 30 minutos a quantidade de 1,2 (2,3) diglicerídeos foi quatro vezes maior que 1,3 diglicerídeos. A razão para a produção de 1,3 diglicerídeos após 5 minutos, pode ser explicada segundo os autores pela isomerização espontânea de 1,2 (2,3) para 1,3 diglicerídeos. Deste trabalho, os autores concluíram que o micélio de *Aspergillus niger* contém uma lipase intracelular de especificidade similar à enzima extracelular de alguns fungos. A enzima produziu máxima quantidade de glicerídeos após curto intervalo de tempo de hidrólise e máxima quantidade de ácidos graxos livres após longo intervalo de tempo, 30 minutos.

ISOBE *et alli*, em 1987 (19), descreveram a purificação, cristalização e caracterização de uma lipase de *Penicillium cyclopium* M1. Esta lipase foi denominada lipase III e foi efetivamente separada das lipases I e II já

descritas por OKUMURA et alii, 1979. Sua separação das demais, foi realizada em cromatografia em coluna de DEAE- Sepharose. A lipase foi purificada 1380 vezes. Dos triglicerídeos testados , trioleína, tricaprilina e tricaprina foram efetivamente hidrolisados pela lipase III; os triglicerídeos trimistirina, tripalmitina, trilaurina, tricaproína e tributirina foram hidrolisados pela lipase III, mas sua taxa foi bem menor quando comparada com trioleína. A enzima mostrou máxima atividade em pH 6,0 e temperatura ótima a 40°C. A lipase apresentou estabilidade em pH na faixa de 4,5-6,0 após incubação a 37°C por 30 minutos. A lipase III apresentou peso molecular de 110.000, provavelmente corresponde a duas subunidades de mesmo peso molecular, estimados por eletroforese em gel SDS. A enzima também hidrolisou rapidamente o substrato sintético p- nitrofenil-laurato (PNPL).

KORITALA, em 1988 (28), estudou a esterificação de ácidos graxos por *Aspergillus flavus*. Em estudos anteriores foi observado que a lipase deste microrganismo hidrolisou óleo de soja produzindo ácidos graxos livres em 3 dias de fermentação. As frações de ácidos graxos livres continham comparativamente menos ácido linoleico e quantidades maiores de ácido oleico no substrato. Os autores concluíram que a lipase de *Aspergillus flavus*, metaboliza preferencialmente ácido linoleico. Esta habilidade pode ter potencial aplicação industrial.

SUGIHARA et alii, em 1988 (57) purificaram e caracterizaram lipase de *Aspergillus niger*. A lipase passou por cinco etapas de purificação: cromatografia hidrofóbica, utilizando Butil Toyopearl 650 M, Sephadex G-75, DEAE Sepharose CL-6B e por último, coluna de Hidroxilapatita. A análise por eletroforese da lipase purificada, mostrou uma única banda. O peso molecular da enzima foi estimado em 35000 em SDS PAGE e coluna cromatográfica Sephadex G-100. O conteúdo de carboidratos foi de 7,0% e a enzima exerceu máxima

atividade em pH 4,5 a 5,5 na temperatura de 25° C, sendo estável na faixa de pH entre 3,0 a 10,5 na temperatura de 30°C por 24 horas. A temperatura ótima em pH 5,0 foi 30°C, sendo estável a 65°C por 30 minutos. A atividade foi fortemente inibida por íons de zinco e ferro. A enzima hidrolisou eficientemente tricaprilina.

YAMAMOTO *et alii*, 1988 (63), em seus estudos sobre lipase alcalina, obtiveram uma lipase de *Pseudomonas sp* que efetivamente hidrolisou óleo de mamona. A lipase desta linhagem foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia DEAE-Celulose e DEAE-Toyorppearl 650 M. O peso molecular da enzima foi estimado em 30000 por eletroforese. O pH ótimo e temperatura ótima da enzima para hidrólise em óleo de oliva foi 7,0 e 60°C respectivamente. A enzima foi estável acima de 35°C em pH 7,0 por 30 minutos e estável em pH 9-10 a 4°C por 22 horas. A atividade foi inibida por Fe<sup>3+</sup> e Hg<sup>2+</sup>, e observou-se aumento da atividade quando no meio de reação estava presente surfactantes não iônicos e sais biliares.

STAJER & MALESZEWSKA, em 1989 (58), otimizaram um meio para produção de lipase extracelular de *Penicillium citrinum* contendo 5% peptona como fonte de nitrogênio e 2% de amido como fonte de carbono. A temperatura de 22°C e pH 7,2 foi o mais efetivo para produtividade da enzima.

LANGRAND *et alii* em 1990 (29), investigaram detalhadamente a influência do comprimento da cadeia de ácidos e álcoois e da natureza dos mesmos na síntese de ésteres utilizando preparações comerciais de lipase de *Mucor miehei*, *Aspergillus*, *Candida rugosa*, e *Rhizopus arrhizus*. Os seguintes ácidos e álcoois foram testados: acético, butírico, propiônico, valérico, capróico e metanol, etanol, butanol, isopentanol, hexanol, citronelol e geraniol. As mudanças produzidas na síntese de éster variaram marcadamente com as preparações de lipase e com as naturezas de ácidos e moléculas de álcool. Lipases de *Aspergillus* foram altamente seletivas para ácidos e álcoois de cadeia curta. *Candida rugosa*

foi mais seletiva tanto para ácidos propiônico e butírico quanto para butanol, hexanol e pentanol. As lipases de *Mucor miehei* e *Rhizopus arrhizus* foram mais seletivas para ácidos de cadeia longa e não foi grandemente influenciada quanto à natureza do álcool. Foi concluído pelos autores que, reações enzimáticas catalisadas por lipases são bastante adequadas para síntese de ésteres, entretanto cada síntese tem uma característica específica e preparações de lipases adequadas e condições experimentais podem ser otimizadas para melhor produção.

OKEKE & OKOLO, em 1990 (42), estudaram as condições necessárias para produção ótima de lipases por *Acremonium strictum*. Xilose foi a mais efetiva fonte de carbono para a indução da atividade lipolítica deste microrganismo. A temperatura ótima de crescimento foi de 30°C. O mais alto nível de crescimento e produção de lipase foi obtido em meio de soja na concentração de 3,5%. A incorporação de 1% (v/v) de tween 80 no meio de cultura aumentou a produção de lipase; enquanto a presença de ácidos graxos livres como, palmítico, oleico, linoleico ou ácido esteárico reduziu tanto o crescimento de fungos como a produção de lipase. A enzima estudada por estes autores mostrou ampla especificidade para substratos solúveis como para lipídeos naturais insolúveis.

Alguns efeitos nutricionais no meio de cultura afetam a produção de lipase de *Rhizopus delemar* como mostrado por ESPINOSA *et alii*, em 1990 (10). Eles encontraram que a enzima produzida por *Rhizopus delemar* pode ser usada como agente flavorizante na produção de produtos de laticínios modificados. Dextrina foi a melhor fonte de carbono quando usada ao nível de 1,0% e extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio na produção de lipase. Quando 2,0% de óleo de oliva foi usado, um aumento de 84,51% na atividade lipolítica foi observado. Tween 80 exerceu um forte efeito. Este pode agir como

um surfactante e também como indutor; sua presença estimula a liberação da enzima e aumenta a atividade lipolítica.

GARCIA *et alii*, em 1991 (12), caracterizaram parcialmente uma lipase de *Aspergillus niger* e estudaram a influência que o pH exerce no meio de reação sobre a especificidade da enzima. A lipase de *Aspergillus niger* foi empregada para hidrolisar manteiga emulsificada. As análises realizadas em HPLC, mostraram que os produtos da reação foram ácidos graxos de cadeia curta ( ácido butírico ), os quais foram preferencialmente hidrolisados a pH 5,0. No entanto é relatado que a taxa de hidrólise para a maioria dos ácidos graxos é na faixa de pH entre 6,0 e 7,0. Foi verificado portanto, a possibilidade de utilização da seletividade da ação lipolítica em manteiga, visando a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que estão associados com o desenvolvimento de flavor característico em queijo. A temperatura ótima para a atuação da lipase foi de 35°C. De todos os íons testados, Ba<sup>++</sup> promoveu a maior taxa de reação enzimática. Os resultados indicaram que Fe<sup>++</sup> aumentou a taxa de hidrólise no mesmo grau que Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>.

RIVERA-MUÑOZ *et alii*, em 1991 (53), estudaram o crescimento de vários fungos em meio sólido que produzissem alta atividade lipolítica, baixo nível de protease e produzisse aroma de produtos de leite. O meio sólido foi composto de farelo de trigo umidificado com solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e solução de traços de elementos descrita por Celerin & Fergus ( 1971 ). *Penicillium candidum*, *Mucor miehei* e *Penicillium camemberti* produziram as melhores atividades lipolíticas e baixa atividade de proteases, sugerindo que a atividade proteolítica afeta a estabilidade da enzima lipolítica.

TOROSSIAN & BELL, em 1991 (60), purificaram e caracterizaram uma lipase ácido resistente de *Aspergillus niger*, utilizando precipitação com álcool, tratamento ácido, exclusão por tamanho e cromatografia de troca iônica e

eletroforese em gel poliacrilamida seguido por eletroeluição. A atividade da enzima junto a trioleína foi examinada usando um substrato emulsificado. Os seguintes produtos de hidrólise foram obtidos: ácido oleico, 1,2- dioléina e 1(2) monoléina. A lipase de *Aspergillus niger* segundo os autores é conhecida ser específica, que hidrolisa as ligações éster dos triglicerídeos nas posições 1 e 3. A sequência N- terminal e análises de aminoácidos foram realizadas. Os aminoácidos encontrados em maior quantidade foram glicina, ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina e serina. O pH ótimo de atividade foi na faixa de 4,4 e 5,5.

PASTORE & PARK, em 1993 (49), estudaram o efeito da proporção molar entre glicerol e ácido oleico no grau de esterificação enzimática para a produção de monoléina, utilizando-se lipase de *Penicillium sp.* A maior percentagem de esterificação para produção de monoléina utilizando-se lipase de *Penicillium sp* foi encontrada quando a concentração de glicerol foi 63,3 vezes maior que a concentração de ácido oleico presente no sistema de reação.

OHNISHI *et alii*, em 1994 (41), estudaram a produção, isolamento e purificação da lipase de *Aspergillus oryzae*. A linhagem de *Aspergillus oryzae* produziu grande quantidade de lipase em meio líquido (GYP), composto de: 2,0% de glucose, 1,0% de extrato de levedura e 2,0% de polipeptona. O pH inicial aceitável para produção de lipase e crescimento celular foi 5,0-6,0. A temperatura ótima para o crescimento de *Aspergillus oryzae* foi reportada entre 32-36°C mas a temperatura ótima para produção de lipase foi de 24°C. O fungo cresceu em cultura sólida, mas produziu pouca quantidade de lipase. Os autores concluíram que isto pode ser o resultado da digestão da lipase pela grande quantidade de protease também produzida. A atividade de lipase foi medida pela titulação de ácidos graxos. Foi verificado a existência de pelo menos dois tipos de lipases, as quais diferem em especificidade quanto ao substrato; uma delas exhibe

alta especificidade contra óleo de oliva e a outra contra o substrato dimercaptobutirato.

POKORNY *et alii*, em 1994 (51), estudaram os efeitos dos fatores nutricionais sobre a biossíntese da lipase de *Aspergillus niger*. Foi observado que amido, quando usado em pequenas quantidades 0,1% no meio fermentativo, estimulou a biossíntese da lipase; a presença de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  quando usado como fonte de nitrogênio junto com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1% como fonte de fosfato igualmente aumentou a atividade lipolítica. A presença de íons de ferro no meio de produção diminuiu a quantidade de lipase e prolongou o tempo de fermentação ; enquanto a adição de íons de magnésio melhorou a produção de lipase. O melhor pH inicial obtido para a produção de lipase foi 5,0. A adição de óleo de oliva ao meio aumentou significativamente a produção de lipase. Os autores concluíram que as condições ótimas para a biossíntese de lipase, diferem de acordo com as várias linhagens de *Aspergillus niger*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Material :**

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

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

**Reagentes específicos:** soro albumina (BIOBRÁS) p-nitrofenil-laurato (PNPL), p-nitrofenol (SIGMA, MERCK).

**Corantes:** Lactofenol e Cotton Blue

**Ácidos Graxos:** ácido láurico, ácido butírico, ácido oléico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido caprílico ( RIEDEL e SIGMA).

**Outros reagentes:** Triton X100 ( Isoctilfenilpolietileno), glicerina (REAGEN)

**Glicerídeos:** 1(3) - monoleína, 1,2 (1.3) - dioleína, trioleína, tributirina, tricaprilina, trilaurina, tripalmitina, triestearina (SIGMA), gordura de côco ( BRASIL ), gordura de leite de cabra, óleo de oliva comercial e monoleína comercial (CERALIT).

**Meios de Cultura:** Potato dextrose ágar (PDA), ágar, peptona, extrato de levedura (DIFCO).

**Resina:** DEAE -celulose (trocador aniônico dietilaminoetil celulose) (SIGMA).

Placas de vidro para cromatografia em camada delgada (TLC) 20 x 20, sílica Gel G-60 (MERCK).

Coluna para Cromatografia líquida de alta eficiência: coluna  $\mu$ Bond Pack C18 125 Å 10 mm (39 x 300mm).

### 3.1.2. Equipamentos

- Agitador de tubos, mod. AT 56 - PHOENIX
- Estufas bacteriológicas, FANEN
- Espectrofotômetro BECKMAN DU-70
- Banhos de água de temperatura controlada, FANEN
- Potenciômetro DEGIMED TE - 902
- Centrífuga refrigerada BECKMAN, mod. J2-21
- Coletor de frações BUCHLER, mod. Fractomette Alpha 200
- Balança analítica METTLER, mod. H-10
- Câmara climática, mod. 346 FANEN
- Banho termostático do respirômetro diferencial GILSON
- Homogeneizador virtual em hélice TECNAL
- Cromatógrafo WATERS 600-E Power Line com detetor WATERS 484 de índice de refração e integrador ao processador Data Módulo WATERS, mod. 746.

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Isolamento de Microrganismos**

Foram isoladas linhagens de fungos de amostras de solo de diversas regiões brasileiras, água, resíduos industriais, alimentos deteriorados, etc. As amostras foram colhidas em sacos plásticos com espátulas e pipetas esterilizadas.

Cerca de 1g de amostra foi colocado em tubos de ensaio com 5mL de água estéril e homogeneizados.

O sobrenadante foi inoculado em placa de Petri, contendo o meio agar batata dextrosado (PDA) por esgotamento. As placas foram incubadas a 30°C até crescimento das colônias por um período de 48h a 96h.

Após este tempo as colônias de fungos foram repicadas em tubos inclinados contendo o mesmo meio. Os tubos foram incubados a 30°C até crescimento satisfatório das colônias.

### **3.2.2. Seleção de fungos produtores de lipase**

#### **3.2.2.1. Fermentação semi-sólida**

Em frascos Erlenmeyer de 500mL, foram adicionados 20g do meio de cultura composto de farelo de trigo e água na proporção 1:1 (p/p). Os frascos foram previamente esterilizados à 121°C, a pressão 1atm, por 15 minutos.

Nestes frascos foram inoculados os microrganismos a serem testados quanto à produção de lipase e incubados por 72 horas a 30°C. Após esse tempo o meio foi homogeneizado com 100mL de água destilada, e deixado em repouso por 1 hora. A filtração foi feita em papel Whatman nº1, e o extrato foi

denominado extrato enzimático bruto, sendo determinada a sua atividade lipolítica.

### **3.2.3. Determinação da atividade lipolítica**

#### **3.2.3.1. Determinação da atividade Enzimática com substrato óleo de oliva**

A atividade da lipase foi determinada incubando-se uma mistura de reação composta de 4mL de tampão acetato pH 5,6 0,05M, 1g de óleo de oliva extra virgem e 1mL de extrato enzimático bruto a 40°C por 60 minutos em banho maria termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após o tempo de reação foi adicionado 15mL de acetona-etanol 1:1 (v/v) para paralisar a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade da enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições acima.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido oleico x mL de KOH 0,05N.

#### **3.2.3.2. Determinação da atividade enzimática com substrato gordura de côco**

A atividade da lipase foi determinada incubando-se uma mistura de reação composta de 4mL de tampão acetato pH 5,6 0,05M, 1g de gordura de côco, e 1mL de extrato bruto enzimático.

A mistura foi incubada a 40°C, por 60 minutos em banho maria termostatizado com agitação de 130 oscilações por minuto.

Após o tempo de reação, foi adicionado 15mL de solução acetona-etanol 1:1 (v/v) para paralisar a reação. Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto de reação nas condições acima.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido láurico x mL de KOH 0,05N.

### **3.2.3.3. Determinação da atividade enzimática com substrato gordura de leite de cabra**

A atividade da lipase foi determinada incubando-se uma mistura de reação composta de 4mL de tampão acetato pH 5,6 0,05M, 1mL de extrato bruto enzimático e 1g de gordura de leite de cabra, obtida por centrifugação do leite de cabra a 7000 rpm por 10 minutos.

A mistura foi incubada a 40°C, por 60 minutos em banho maria termostaticado com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada, adicionando 15mL acetona-etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu$ mol de ácido graxo por minuto de reação nas condições acima.

O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de ácido caprílico x mL de KOH 0,05N.

#### **3.2.3.4. Determinação da atividade enzimática com substrato *p*-nitrofenil-laurato (PNPL).**

A atividade de lipase sobre o substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato foi determinada misturando-se 0,95mL do substrato que foi preparado dissolvendo-se 161mg de *p*- nitrofenil-laurato (PNPL) em 190mL de tampão acetato de concentração 0,05M, pH 5,6, contendo 2,1% de Triton X-100 pré-incubado a 37° C, com 0,05mL da solução enzimática.

A mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos, sendo a reação paralisada pela adição de 2mL de acetona. A cor amarela produzida pela liberação do *p*-nitrofenol é quantificada pela medida de absorbância da mistura de reação a 410 nm. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera *p*-nitrofenol expresso em  $\mu\text{mol}$  de *p*-nitrofenol por minuto, por mL de enzima. O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando-se uma curva padrão de concentração de *p*-nitrofenol em  $\mu\text{moles}$  x absorbância a 410 nm.

#### **3.2.4. Produção de lipase pela linhagem de *Aspergillus sp***

Para o estudo da produção de lipase pelas linhagens de *Aspergillus sp* selecionadas de acordo com o item 3.2.2 , foi utilizado a fermentação semi-sólida e líquida.

##### **3.2.4.1. Produção de lipase por fermentação semi-sólida pela linhagem de *Aspergillus sp***

O meio de cultura foi composto de farelo de trigo e água na proporção 1:1 (p/p). Os frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 20g de meio de

cultura previamente esterilizados, foram inoculados com 1 mL de suspensão homogênea de esporos, preparada com água destilada estéril e com esporos de cultura de 96 horas do microrganismo em meio inclinado de ágar batata dextrosado (PDA). Os frascos foram incubados a 30°C por 72 horas.

Após a incubação foram adicionados 100mL de água destilada em cada frasco. Os meios de cultura foram homogeneizados com bastão de vidro, e após permanecer em extração por 1 hora com agitação ocasional, foram filtrados em papel Whatman nº 1 e coletados num único recipiente.

Ao filtrado foi acrescentado sulfato de amônio na concentração de 80% com agitação lenta. A mistura foi deixada a 4°C por uma noite. O precipitado foi centrifugado a 7.000 rpm por 15 minutos e dialisado contra água destilada em membrana de acetato por 48 horas a 4°C. Posteriormente foi liofilizado e triturado em almofariz à granulação mais fina possível e conservado em freezer a -20°C. Esta preparação foi designada lipase bruta.

#### **3.2.4.2. Produção de lipase de *Aspergillus sp* por fermentação líquida**

O meio de cultura foi composto de farelo de arroz 5,0% e 3,0% de água de maceração de milho ( corn steep liquor) ao qual foi acrescentado 0,2% de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH 6,0. Os frascos Erlenmeyer de 250 mL com 40 mL de meio foram esterilizados e inoculados com 1mL de solução homogênea de esporos preparada com água destilada estéril e com esporos obtidos de cultura de 96 horas do microrganismo em meio inclinado de ágar batata dextrosado (PDA) e incubados a 30°C com agitação de 150 rpm por 96 horas.

### **3.2.5. Estudo dos parâmetros para a produção de lipase por fermentação semi-sólida**

#### **3.2.5.1. Estudo da composição do meio semi-sólido**

Com o objetivo de implementar a produção da enzima por fermentação semi-sólida, foram testados os seguintes meios:

1- Presença de cloreto de cálcio. Em frasco Erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 20g do meio de cultura, composto de farelo de trigo e água, na proporção de 1:1 (p/p) adicionados de 1 mL de cloreto de cálcio 1,0%. Os frascos foram previamente esterilizados a 121°C pressão de 1 atm, por 15 min. Nestes frascos foram inoculados as linhagens selecionadas e incubadas por 72 horas a 30°C. Após este tempo, o meio foi homogeneizado com 100 mL de água destilada, e deixado em repouso por uma hora. A filtração foi feita em papel Whatman nº 1, obtendo-se o extrato enzimático bruto, e sua atividade lipolítica foi determinada como no item 3.2.3.1.

2- Presença de minerais. Em frascos Erlenmeyer de 500 mL, foram adicionados 20 g do meio de cultura, composto de farelo de trigo umidificado com 20 mL de solução contendo em gramas/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,4),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (16,8),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5) e 1 mL de solução contendo, em gramas/L: glucose (10,0),  $\text{KNO}_3$  (2,0),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,0),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5), biotina (0,000005), tiamina (0,0001) e 1 mL de solução de micro elementos contendo em mg/L:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (439,8),  $\text{FeNO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (723,5) e  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (203).

Os frascos foram previamente esterilizados a 121°C ,pressão de 1 atm, por 15 min. Nestes frascos foram inoculadas as linhagens selecionadas e incubadas por 72 horas a 30°C. Após este tempo, o meio foi Homogeneizado

com 100 mL de água destilada, e deixado em repouso por uma hora. A filtração foi feita em papel Whatman nº 1, obtendo-se o extrato enzimático bruto, e sua atividade lipolítica foi determinada como no item 3.2.3.1.

### **3.2.5.2. Efeito da proporção entre água e farelo de trigo no meio de crescimento na produção da enzima por fermentação semi-sólida**

Foram utilizados para produção de lipase de *Aspergillus sp.* frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 20g de meio semi-sólido, composto de farelo de trigo e água destilada nas proporções de 10 a 70% (p/p). Os frascos foram esterilizados por 15 minutos a 121°C e 1 atm de pressão e inoculados com 1mL de suspensão de esporos. Os frascos foram incubados a 30°C.

Após 72 horas de crescimento, foi realizada a extração da enzima, adicionando-se ao meio 100mL de água destilada. O meio foi homogeneizado e os frascos foram deixados em repouso por uma hora para a extração da enzima. Este macerado foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e no filtrado foi medida a atividade enzimática como descrito no item 3.2.3.1.

### **3.2.5.3. Estudo do efeito do tempo de Incubação na produção de lipase.**

Frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 20g do meio de cultura descrito no item 3.2.2.1., foram inoculados e incubados com as linhagens selecionadas a 30°C por um período de no máximo 144 horas. A cada 24 horas foi retirado um frasco para a obtenção do extrato enzimático bruto. A atividade lipolítica foi determinada como no item 3.2.3.1 e também foi realizada a medida de pH durante o tempo de incubação.

#### **3.2.5.4. Estudo do efeito da temperatura de Incubação do meio semi-sólido na produção de lipase**

Frascos Erlenmeyer de 500mL contendo 20g do meio descrito no item 3.2.2.1., foram inoculados e incubados por 72 horas nas seguintes temperaturas: 25°C, 30°C, 35°C, 40°C e 45°C. Após esse tempo obteve-se o extrato enzimático bruto descrito no item 3.2.2.1 e a atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.3.1.

#### **3.2.6. Caracterização bioquímica da lipase bruta, produzida pela linhagem de *Aspergillus sp.***

##### **3.2.6.1. Efeito do pH na atividade enzimática**

Foram preparadas as seguintes soluções tampão: tampão acetato 0,1M pH 3,6 , 4,0 , 4,5 , 5,0 e 5,6. Tampão fosfato 0,1M pH 6,0 , 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. Tampão tris-HCl 0,1M pH 8,0, 8,5 e 9,0.

Em Erlenmeyers de 125 mL, foram preparados sistemas de reação compostos de 1 g de óleo de oliva ou 1 g de gordura de leite de cabra, 4 mL de cada solução tampão descrita acima e 1 mL de solução enzimática . A mistura foi incubada a 40°C por 60 minutos com agitação de 130 rpm.

Após este período, a reação foi paralizada com 15 mL de acetona-etanol 1:1 (v/v) e os ácido graxos liberados foram titulados contra KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

### **3.2.6.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima**

Dois mL da solução enzimática foram misturados com dois mL de cada solução tampão descrita no item anterior.

O sistema de reação foi deixado por 24 horas a temperatura de 25°C. Após esse tempo 1mL da mistura foi retirado e determinada sua atividade lipolítica residual como no item 3.2.3.1.e 3.2.3.3.

### **3.2.6.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima**

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com o item 3.2.3.1.e 3.2.3.3., utilizando-se as temperaturas de 25°C, 30°C, 37 °C, 40°C, 45°C, 50°C e 60°C.

### **3.2.6.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima**

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, 3mL de extrato bruto enzimático foi incubado durante 1 hora nas seguintes temperaturas: 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C e 70°C. Após esse período tomou-se 1mL da enzima assim tratada e determinou-se a atividade lipolítica residual, como no item 3.2.3.1.e 3.2.3.3.

### **3.2.7. Hidrólise de glicerídeos pela lipase bruta de *Aspergillus sp***

O acompanhamento da reação de hidrólise dos substratos óleo de oliva, gordura de côco e monoleína comercial, foi realizado incubando-se a 40°C o sistema de reação composto de 1 grama dos substratos descritos acima, 4mL de

tampão acetato 0,05N pH 5,6, e 1mL de solução de enzima bruta por tempo de reação variável de: 2 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas.

A reação foi paralisada pela adição de 15 mL de acetona-etanol (1:1), os ácidos graxos liberados foram titulados contra solução de KOH 0,05N. Para o cálculo da porcentagem de hidrólise, considerou-se o número de saponificação resultante nos substratos.

$$\% \text{ Hidrólise} = \frac{\text{mL KOH } 0,05\text{N}}{\text{N}^\circ \text{ de saponificação}} \times 100$$

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

### **3.2.8. Cromatografia em camada delgada (TLC) dos produtos de hidrólise por ação de lipase de *Aspergillus sp***

A Cromatografia em Camada Delgada foi realizada, misturando-se 45g de sílica gel G-60 ( Merk ) com 90mL de solução de ácido bórico 0,3M. A mistura foi aplicada em placas de vidro 20 x 20cm de dimensão, com 2mm de espessura, com aplicador Desaga e colocadas em estufa a 100°C por 40 minutos para ativação. O sistema de solventes utilizado para a cromatografia foi éter de petróleo, éter etílico, e ácido fórmico na proporção 210:90:0,4 (v/v) respectivamente.

O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de aproximadamente 35 minutos. Foram utilizados como padrões trioleína, (1,3) - dioleína , 1 -monoleína na concentração de 1% em solução acetona:etanol 1:1 (v/v).A revelação do cromatograma foi feita através da colocação da placa de

cromatografia em câmara de iôdo sublimado, aquecendo-se a 110°C por 45 minutos.

### **3.2.9. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos produtos de hidrólise dos glicerídeos pela lipase**

Os ácidos graxos e os glicerídeos presentes nas amostras de óleo vegetal hidrolisados foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência. Utilizou-se coluna de fase reserva ODS-RP-C18 de diâmetro interno de 4,6mm, DP5µm, 25cm de comprimento, à temperatura de 30°C, com fase móvel acetona: acetonitrila 1:1 (v/v) com taxa de fluxo de 1mL/minuto. Os glicerídeos 1-monoleína, (1,3) dioleína, trioleína e ácido oleico foram identificados por comparação do tempo de retenção com os padrões 1-monoleína, (1,3)-dioleína, trioleína e ácido oleico. As porcentagens relativas dos glicerídeos, foram obtidas pelo método de integração de áreas utilizando-se o integrador e processador automático Data Módulo WATERS.

### **3.2.10. Identificação das linhagens produtoras de lipase**

Os microrganismos produtores de lipase foram identificados através das características taxonômicas, de acordo com RAPER & FENNEL(1965) citado em DOMSCH,GAMS & ANDERSON (7)

### **3.2.11. Estudo da especificidade da enzima bruta**

A enzima bruta foi analisada quanto à especificidade pelo substrato, através da análise dos produtos de hidrólise utilizando-se monoleína, e trioleína

como substrato. O meio de reação foi composto de 1mL do extrato bruto, 2mL de tampão acetato 0,05M pH 5,6 e 0,5 gramas dos substratos citados acima

A mistura foi incubada a 40°C, por 3 horas em banho termostático com agitação de 130 oscilações por minuto. A reação foi paralisada, adicionando 15 mL de solução de acetona-etanol 1:1 (v/v). Os ácidos graxos foram titulados contra solução KOH 0,05N, utilizando-se fenolftaleína como indicador.

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação nas condições acima.

### **3.2.12. Determinação de carboidratos totais presentes na lipase**

O conteúdo de açúcares totais presentes na lipase purificada foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico de acordo com DUBBOIS et alii (8).

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

Para a determinação do número de saponificação, foram misturados em balões de 250mL, 1g de gordura de côco, gordura de leite de cabra e óleo de oliva alternadamente, 25mL de KOH alcoólico 1N e 4mL de tampão acetato pH 5,6 0,05M.

A mistura da reação foi aquecida à temperatura de ebulição por 40 minutos e após este período a solução de KOH remanescente foi titulada contra solução de HCl 1N, utilizando-se fenolftaleína como indicador. Foi preparado um branco para cada mistura, o qual não continha a gordura. O número de saponificação é dado como:

$$N_s = [ \text{mL gasto HCl (branco)} - \text{mL gasto HCl (amostra)} ] \times N \text{ HCl} / N \text{ KOH } 0,05$$

### 3.2.14. Estudo da composição de meio para fermentação líquida

Cerca de 9 tipos de meios de cultura foram testados com o objetivo de verificar a melhor composição para a produção de lipase por fermentação líquida. Os seguintes meios foram testados:

1- Meio de cultura contendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,04%,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1%, sacarose 1%, e óleo de oliva 1%.

2- meio de cultura contendo "soybean meal" 2%, peptona 1%, amido solúvel 1%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1%,  $\text{CaCO}_3$  0,5%.

3- meio de cultura contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%, peptona 1%,  $\text{KCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5%, Tween 80 1% e glicose 1%

4- meio de cultura contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%,  $\text{NaNO}_3$  1%,  $\text{KCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5%, monoleína 1% e sacarose 2%.

5- meio de cultura contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,6%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%, uréia 1%,  $\text{KCl}$  0,1%,  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,5%, Tween 80 1% e xilose 1%.

6- meio de cultura contendo farelo de trigo 2%, "soybean meal" 0,5%,  $\text{CaCO}_3$  0,3%.

7- meio de cultura contendo farelo de arroz 5%, água de masceração de milho 3% e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,2%.

8- meio de cultura contendo óleo de soja 2%, extrato de malte 0,5%,  $\text{NaNO}_3$  0,3%,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,1%,  $\text{KCl}$  0,05%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,05% e  $\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,001%.

9- meio de cultura contendo 2% de óleo de mamona, 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1%  $\text{NaCl}$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de extrato de levedura.

O meio de cultura selecionado foi composto de: 2% de óleo de mamona, 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1%  $\text{NaCl}$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de extrato de levedura, pH 7,0.

Frascos Erlenmeyer de 250mL, com 20mL do meio selecionado, esterilizado, foram inoculados com uma alçada das culturas das linhagens em estudo e incubados por 72 horas. Após esse tempo, o meio de cultura foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. No sobrenadante livre de células foi medida a atividade enzimática como descrito no item 3.2.3.2 e 3.2.3.3.

#### **3.2.14.1. Efeito da presença de óleos e gorduras como indutores de produção de lipase por fermentação líquida**

Com o objetivo de implementar a produção de lipase através da fermentação líquida, foram testados diferentes tipos de óleos como: óleo de mamona, gordura de côco e óleo de oliva, que são citados na literatura como indutores para a produção de lipase. Foi preparado um meio controle, sem indutor.

Os meios de cultura foram compostos de: 2% de diferentes óleos, como descrito acima, 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{NaCl}$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de extrato de levedura, sendo esterilizados a 121°C por 15 minutos a 1atm de pressão e inoculado com uma alçada de cultura de 96 horas de crescimento do microrganismo em PDA.

Os meios assim preparados foram incubados a 30°C por 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Após esse tempo, o meio de cultura foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C. No sobrenadante livre de células foi medida a atividade enzimática como descrito no item 3.2.3.2 e 3.2.3.3.

### **3.2.15. Purificação da lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068**

A lipase bruta produzida através de fermentação semi-sólida pela linhagem n° 1068, foi purificada utilizando-se fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de DEAE celulose.

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

Para a purificação da enzima, o extrato bruto aquoso obtido no processo fermentativo, foi saturado com sulfato de amônio até 80%. A mistura foi deixada em repouso por uma noite a 4°C, sendo depois centrifugada a 7000 rpm por 15 minutos, reservando-se o precipitado. O precipitado obtido foi dialisado contra água destilada em membrana de acetato por 48 horas a 4°C.

#### **3.2.15.2. Cromatografia em coluna de DEAE - Celulose**

Foram utilizados 20g de DEAE-Celulose, tratada primeiramente com 500mL de NaOH 1N e 500 mL de HCl 1N, sendo que entre as etapas a resina foi lavada com água destilada para remoção dos reagentes. Finalmente a resina foi tratada com solução tampão fosfato de potássio 0,01M pH 8,0 para sua estabilização. A resina foi então acondicionada em coluna de vidro de 2,5cm de diâmetro e 36,5 cm de comprimento.

Após a aplicação da solução enzimática na coluna, contendo 25620 unidades de atividade, esta foi eluída através da adição de solução de NaCl em gradiente crescente de concentração desde 0,1 a 0,8M consecutivamente.

O curso da eluição de proteínas da coluna, foi seguido pela medida da absorbância em espectrofotômetro a 280nm. Foi medida atividade de lipase nos substratos gordura de côco e *p*-nitrofenil-laurato (PNPL) como descritos nos itens 3.2.3.2. e 3.2.3.4. As frações que apresentaram atividade de lipase foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato de potássio 0,01M pH 8,0, em membrana de acetato de celulose por 24 horas.

### **3.2.16. Dosagem de proteína pelo método de LOWRY.**

Para a determinação da concentração de proteína nas diferentes fases de purificação foi utilizado o método de LOWRY(34) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

### **3.2.17. Caracterização Bioquímica da lipase parcialmente purificada linhagem n° 1068 utilizando substrato PNPL**

#### **3.2.17.1. Efeito do pH na atividade da enzima**

O estudo do efeito do pH na atividade da enzima purificada, foi realizado em sistema de reação constituído de 0,95mL do substrato e 0,1 mL da enzima deixando-se reagir por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 2 mL de acetona.

Preparo do substrato: dissolveu-se 161mg de (PNPL) em 190mL de tampão acetato pH 5,6 contendo 2,1% de Triton X-100 pré-incubado a 37 °C.

Os diversos tampões foram utilizados de acordo com a sua capacidade tamponante, sendo pH 3,6 a 5,6 tampão acetato, pH 6,0 a 6,5 tampão

citrato e pH 7,2 a 8,0 tampão tris-HCl. Todos os sistemas tampões foram usados na concentração de 0,1M.

#### **3.2.17.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima**

Para o estudo do efeito do pH na estabilidade enzimática foram tomados 0,1mL de solução enzimática aos quais foi adicionado 0,2mL de solução tampão nos diferentes valores de pH, como descrito no item anterior, na concentração 0,1M permanecendo por 24 horas à temperatura de 30°C. Após este período foi acrescentado ao sistema 0.65mL do substrato PNPL como preparado no item 3.2.3.4. e determinada atividade remanescente como descrito no mesmo item.

#### **3.2.17.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima**

Para a verificação da temperatura na atividade enzimática, o sistema de reação foi constituído de 0,95mL do substrato PNPL como preparado no item 3.2.3.4 e 0,1mL da enzima. A mistura foi incubada por 30 minutos a diferentes valores de temperatura (25 a 60 °C). Após a incubação, foi determinada a atividade de lipase como descrito no item 3.2.3.4.

#### **3.2.17.4. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima**

Para o estudo do efeito da temperatura na estabilidade da enzima, amostras de 0,1mL de solução enzimática foram misturados em tubos de ensaio tampados e pré-incubados em diferentes temperaturas entre 25 a 60°C durante 1 hora. Após este tempo, a atividade lipolítica remanescente foi determinada como descrito no item 3.2.3.4.

### **3.2.17.5. Influência da concentração de substrato na atividade da enzima**

A influência da concentração do substrato na atividade de lipase, foi verificada com substrato *p*-nitrofenil-laurato( PNPL). O sistema de reação foi constituído por 0,95 mL de substrato de concentração variável entre 0,05 mM a 10 mM, dissolvido em tampão acetato pH 5,6 0,05M e 0,1 mL da solução de enzima purificada contendo 7,8 e 9,86 Unidades de atividade .

As misturas de reação foram incubadas a 37°C por 30 minutos e a atividade enzimática foi determinada de acordo com o item 3.2.3.4. Para este estudo a constante de Michaelis-Menten (  $K_m$  ) e a velocidade máxima (  $V_{máx}$  ) foram determinadas segundo o sistema gráfico de LINEAWER & BURK (32).

### **3.2.18. Estudo da ação de esterificação pela lipase bruta de *Aspergillus sp***

Para o estudo de esterificação usou-se um sistema de esterificação composto de glicerol e ácido oleico na proporção 40:1 (p/p) e 150mg de enzima bruta. A enzima foi adicionada ao sistema após a homogeneização prévia do ácido oleico e glicerol. O sistema foi incubado em banho maria a 40°C por 144 horas com agitação de 300 rpm. Foram retiradas alíquotas de 2mL nos seguintes tempos de reação: 0 h, 2 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h. Destas alíquotas, 1mL foi dissolvido em 5mL de acetona-etanol 1:1 (v/v) e os glicerídeos formados foram extraídos com éter etílico. Em seguida foram aplicados em cromatografia líquida de alta eficiência como descrito em 3.2.9.

## **4- RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 Isolamento e seleção de microrganismos**

#### **4.1.1 Seleção preliminar de microrganismos produtores de lipase**

Foram isoladas 689 linhagens de fungos das diversas regiões do Brasil, e testadas quanto à capacidade de hidrolisar óleo de oliva, gordura de côco e gordura de leite de cabra, através da produção de lipase extracelular. Das 689 linhagens estudadas foram pré selecionadas as de número 1068, 1541, 905 e 1099, por apresentarem alta atividade de lipase determinada de acordo com o descrito em 3.2.2.

A tabela 1, indica a atividade dos extratos brutos enzimáticos das linhagens selecionadas com relação aos substratos óleo de oliva, gordura de côco, e gordura de leite de cabra

**TABELA 1: Seleção preliminar de microrganismos para produção de lipase**

Nº da linhagem	Óleo de oliva $\mu$ moles oleico/min/mL	SUBSTRATOS	
		Gordura de côco $\mu$ moles láurico/min/mL	Gordura de leite de cabra $\mu$ moles de ácido caprílico/min/mL
905	0.007	0.010	2.110
1068	0.140	6.320	0.230
1099	0.016	0.230	2.200
1541	0.129	6.150	0.190

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

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

#### 4.1.2. Seleção dos microrganismos melhores produtores de lipase

As linhagens de números 1068 e 1099 foram selecionadas como as melhores produtoras de lipase, dentre as quatro linhagens preliminarmente selecionadas. A linhagem de nº 1068 apresentou maior atividade de lipase na presença dos substratos óleo de oliva e gordura de côco , enquanto a linhagem de nº 1099 apresentou melhor atividade no substrato gordura de leite de cabra. É conhecido da literatura que as lipases têm diferentes especificidades frente ao substrato, de acordo com sua origem. Assim lipases de *Mucor sp* e *Geotrichum sp* atuam preferencialmente em triglicerídeos contendo principalmente ácido oleico (óleo de oliva);entretanto as lipases de *Penicillium sp* apresentam melhor atividade quando no meio de reação está presente monobutirina, metil butirato e óleo de oliva.

As lipases de *Aspergillus sp* possuem ampla especificidade quanto ao substrato segundo relatos citados por:

SHIPE (54), encontrou que diferentes proporções de ácido butírico e ácido caprílico foram liberados de misturas com concentrações equimolares de tributirina e tricaprilina por lipases de *Aspergillus niger* e *Penicillium roqueforti*.

FUKUMOTO et alii (11) purificaram e cristalizaram uma lipase secretada por *Aspergillus niger* que hidrolisou quase que completamente triglicerídeos do óleo de oliva.

HOOVER et alii (17) estudaram as propriedades de uma lipase de *Aspergillus flavus* que hidrolisou gordura de côco.

GARCIA et alii (12) empregaram uma lipase de *Aspergillus niger* para hidrolisar substrato de manteiga emulsificado. A lipase liberou ácidos graxos de cadeia curta, ácido butírico e ácidos graxos de cadeia média.

SUGIHARA et alii, (57) estudando a caracterização de lipases de *Aspergillus niger*, testou a atividade das lipases junto a diferentes triglicerídeos e observou que esta hidrolisava mais facilmente substratos com 4, 8, 10 e 18 átomos de carbono.

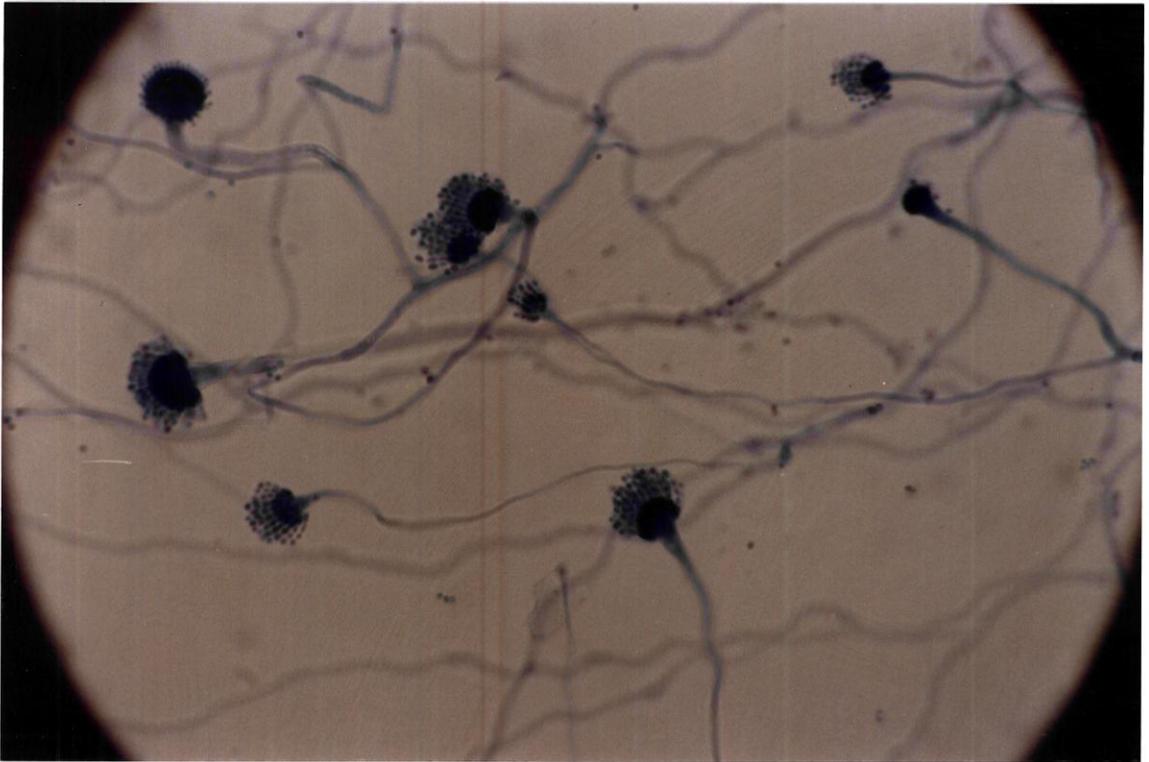
As linhagens que foram selecionadas para os estudos, atuaram em substratos diferentes quanto ao nº de átomos de carbono. A lipase da linhagem nº 1068 atua melhor sobre substratos contendo 18 e 12 carbonos como o óleo de oliva e gordura de côco, lipase da linhagem nº 1099 parece agir melhor sobre substratos contendo 8 átomos de carbono, como os ácidos graxos presentes na gordura de leite de cabra.

#### **4.2 Identificação das linhagens produtoras de lipase.**

As linhagens de número 1068 e 1099 melhores produtoras de lipase, foram identificadas como *Aspergillus sp* de acordo com as características taxonômicas descritas por RAPER & FENNELL. As características microscópicas estão ilustradas nas figuras 1A e 1B que mostram as fotomicrografias dos microrganismos, com aumento de 400 vezes.



**Figura 1A - Fotomicrografia da linhagem n° 1068 de *Aspergillus sp***



**Figura 1B - Fotomicrografia da linhagem n° 1099 de *Aspergillus sp***

As colônias das linhagens de nº 1068 e nº 1099 apresentaram crescimento moderado em meio PDA (Potato- Dextrose -Ágar) quando incubadas a 30°C, pigmentação preta para a linhagem de nº 1068 e pigmentação verde para a linhagem de nº 1099.

Como pode ser verificado nas figuras 1A e 1B, o conidióforo é composto de estipe, vesícula ligeiramente esférica (linhagem nº 1068) não totalmente coberto de fiálides. Pode também ser observada a produção de conídios eretos em cadeias, características morfológicas típicas de fungos do gênero *Aspergillus*.

#### 4.3. Produção de lipase pelas linhagens de *Aspergillus sp*

Foram utilizados dois processos fermentativos para produção de enzima de acordo com o método descrito no item 3.2.4. Destes foi escolhido o processo por fermentação semi-sólida por apresentar maior atividade lipolítica do que a fermentação líquida. Os resultados estão dispostos na tabela 1A.

TABELA 1A: Seleção do meio de cultivo para produção de lipase por *Aspergillus sp*

Tipos de meios	Linhagem nº 1068		Linhagem nº 1099	
	Óleo de oliva	Gordura	Gordura	Óleo de oliva
		leite de cabra	leite de cabra	
	umoles ac. oleico/min/ml.	umoles ac. caprílico/min/ml.	umoles ac. caprílico/min/ml.	umoles ac. oleico/min/ml.
Meio semi- sólido	0,140	0,230	2,200	0,016
Meio líquido	0,008	0,000	0,193	0,000

TSUJISAKA *et alli*, (61) estudaram algumas propriedades de lipases fúngicas e observaram que *Aspergillus niger* produziu lipase especialmente em meio sólido composto de farelo de trigo e  $\text{CaCO}_3$

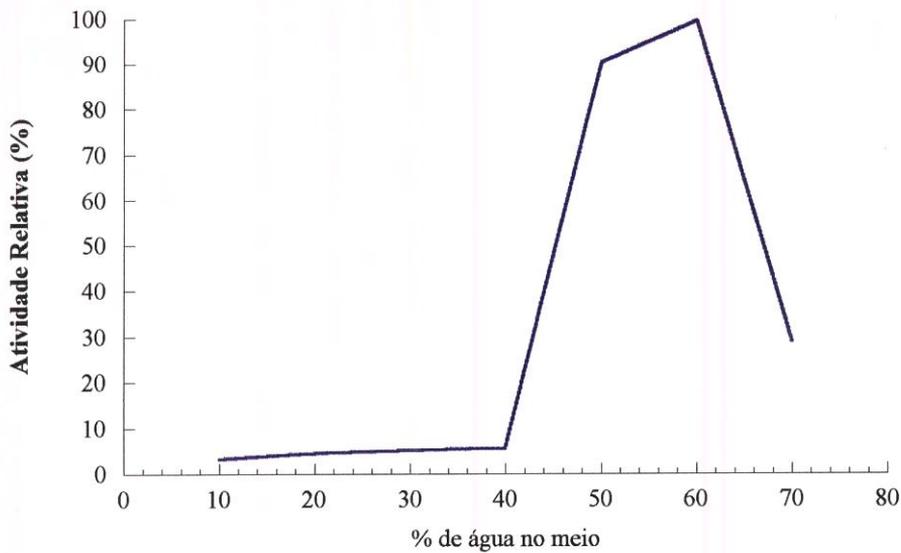
FUKUMOTO *et alli*, (11) selecionaram uma linhagem de *Aspergillus niger* que produziu grande quantidade de lipase, quando o fungo cresceu em farelo de trigo (ProcessKoji).

RIVERA-MUÑOZ *et alli*, (53) na produção de lipases microbianas e geração de "flavor", utilizou-se de fermentação semi-sólida incubando fungos filamentosos como *Penicillium camemberti*, *Penicillium candidum* e *Mucor miehei* em farelo de trigo e solução de minerais obtendo alta atividade lipolítica.

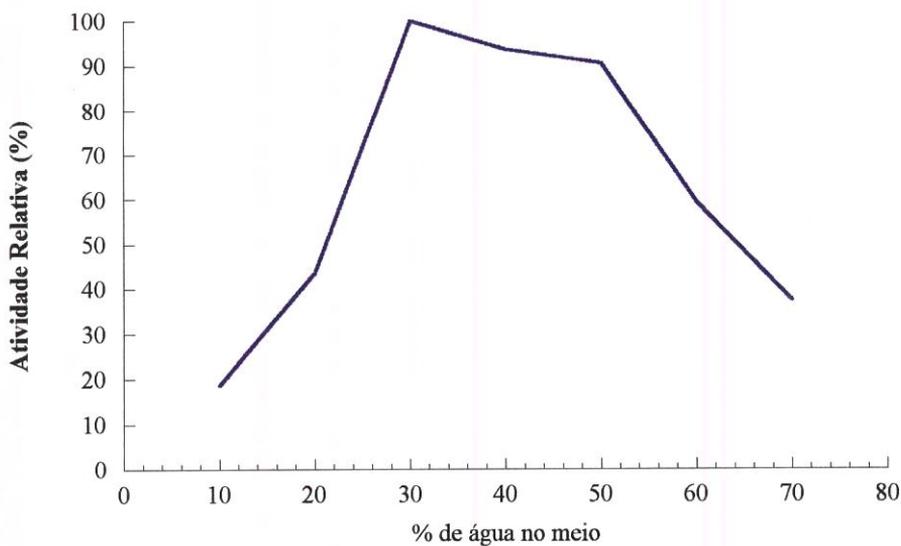
OHNISHI *et alli*, (41) estudaram a produção de lipase de *Aspergillus oryzae* em cultura semi-sólida, e observaram que o fungo cresceu em meio semi-sólido, mas produziu pouca quantidade de lipase. Os autores concluíram que isto pode ser o resultado da digestão da lipase pela grande quantidade de protease também produzida.

#### **4.3.1. Efeito da proporção entre farelo de trigo e água na produção da enzima por fermentação semi-sólida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito no item 3.2.5.2. As figuras 2A e 2B mostram as atividades relativas medidas após 72 horas de incubação. A maior atividade de lipase encontrada foi quando a relação água : farelo de trigo foi entre 50:50 a 60:40, referente a linhagem de número 1068 e entre 30:70 a 50:50 referente a linhagem de número 1099.



**Figura 2A-** Efeito da proporção entre água e farelo de trigo no meio de crescimento na produção da enzima de *Aspergillus sp*- linhagem n° 1068 por fermentação semi-sólida.



**Figura 2B-** Efeito da proporção entre água e farelo de trigo no meio de crescimento na produção da enzima de *Aspergillus sp*- linhagem n° 1099 por fermentação semi-sólida.

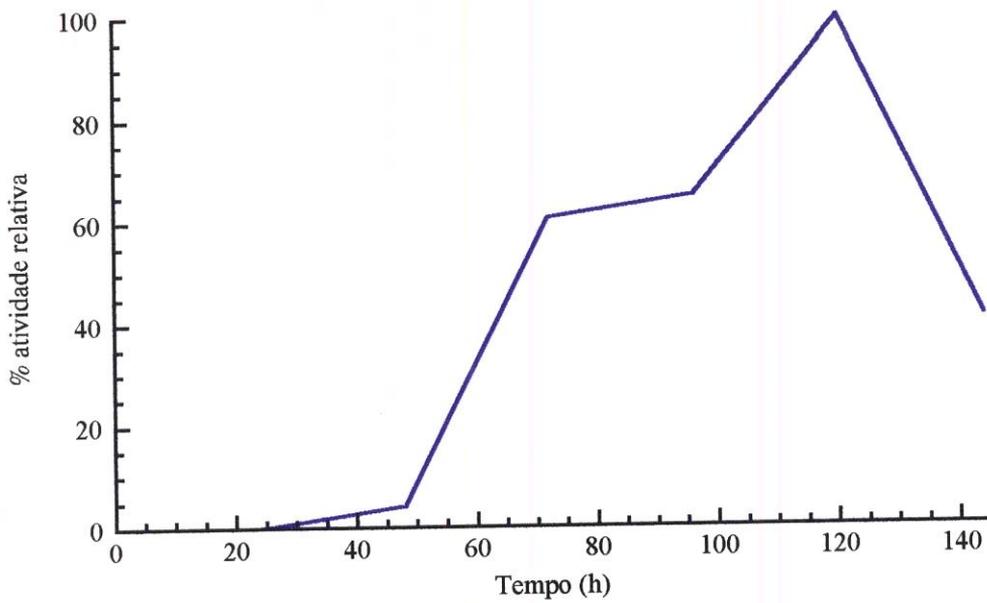
#### 4.3.2. Estudo do efeito do tempo de incubação para produção de lipase.

As figuras 3A e 3B mostram as atividades lipolíticas relativas medidas após incubação à temperatura de 30°C, segundo item 3.2.5.3.

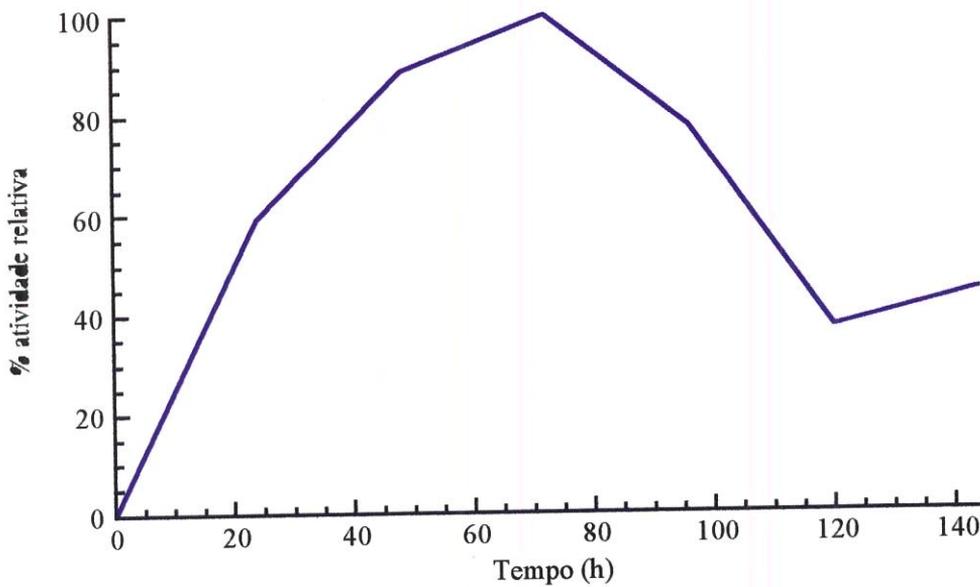
A maior atividade de lipase foi encontrada após 120 horas de incubação do meio para a lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068 e 72 horas de incubação para a lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1099.

Pode-se observar através do estudo comparativo das lipases de n° 1068 e n° 1099 que há uma variação significativa entre o tempo de incubação destas 2 linhagens para produção de lipase. A linhagem n° 1099 produz lipase em menos tempo que a linhagem de n° 1068.

CHANDER *et alli*, (6) estudaram os fatores que afetam a produção de lipase de *Aspergillus wentii*, e observaram que a produção máxima de lipase foi obtida quando o fungo cresceu a 30°C por 72 horas em meio líquido, composto por: 2% de peptona, 0,5% extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, e 1% de dextrose.



**Figura 3A-** Efeito do tempo de incubação na produção de lipase de *Aspergillus sp-* linhagem nº 1068



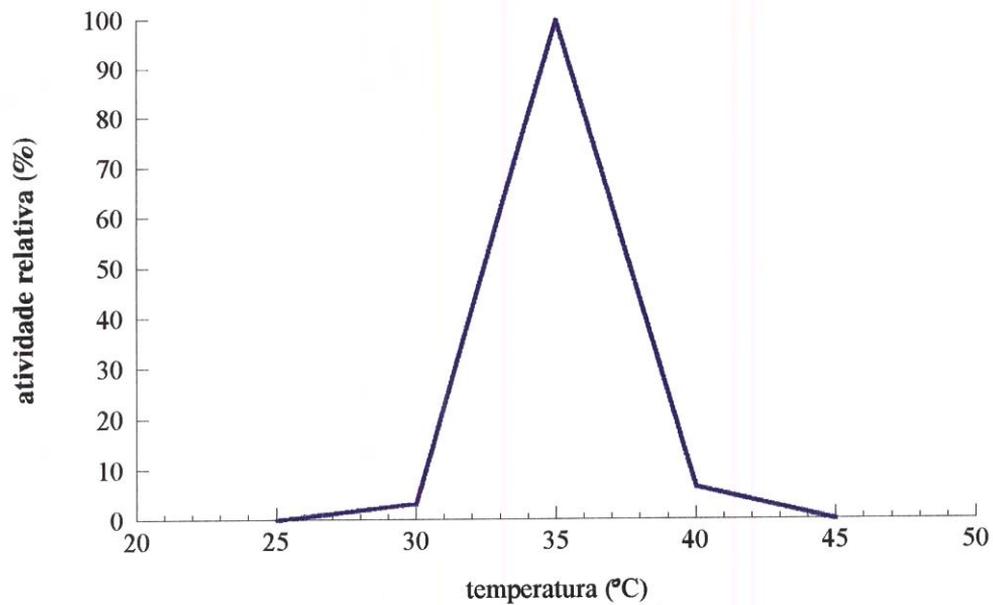
**Figura 3B-** Efeito do tempo de incubação na produção de lipase de *Aspergillus sp-* linhagem nº 1099

### 4.3.3. Estudo do efeito da temperatura de incubação na produção de lipase.

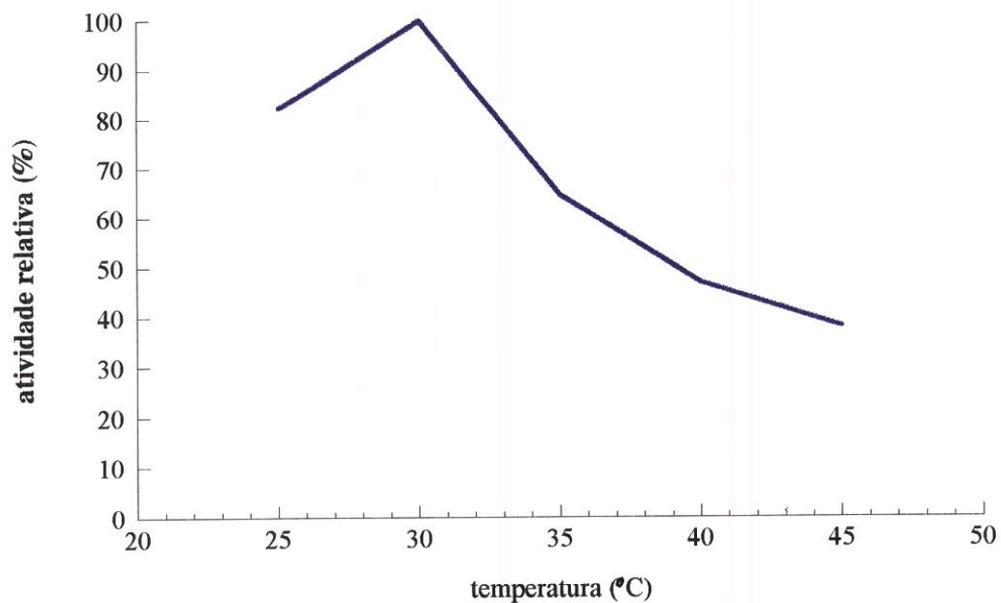
A máxima produção de enzima, foi obtida à temperatura de 35°C e 30°C após 72 horas de incubação para as lipases de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068 e n° 1099 respectivamente, em meio composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1. Os resultados estão dispostos nas figuras 4A e 4B.

PAL *et alli* (48) estudaram a produção de lipase por *Aspergillus niger* em cultura submersa, e concluíram que as condições ideais para a produção de lipase, foram obtidas com 96 horas de incubação a 35°C .

OHNISHI *et alli* (41) estudaram a produção de lipase por *Aspergillus oryzae* e concluíram que a temperatura de incubação para a produção de lipase foi de 24°C.



**Figura 4A-** Efeito da temperatura de incubação na produção da enzima de *Aspergillus sp.* - linhagem n° 1068 por fermentação semi-sólida



**Figura 4B-** Efeito da temperatura de incubação na produção da enzima de *Aspergillus sp.* - linhagem n° 1099 por fermentação semi-sólida

#### 4.4 Caracterização bioquímica das lipases brutas, produzidas pelas linhagens números 1068 e 1099 de *Aspergillus sp.*

As lipases brutas produzidas de acordo com o item 3.2.4.1 foram utilizadas para o estudo de caracterização da lipase. As lipases brutas de *Aspergillus sp* linhagem nº 1068 foi caracterizada utilizando-se óleo de oliva como substrato e a lipase de *Aspergillus sp* linhagem nº 1099 foi caracterizada utilizando-se gordura de leite de cabra como substrato.

##### 4.4.1. Efeito do pH na atividade das enzimas

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado como descrito no item 3.2.6.1. O pH ótimo para a lipase de *Aspergillus sp* nº 1068 foi 5,6 enquanto que para a lipase de *Aspergillus sp* nº 1099 foi 6,0. Os resultados estão dispostos nas figuras 5A e 5B.

SHIPE (54) estudou a especificidade relativa de lipases produzidas por *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger* e verificou que o pH ótimo das enzimas foi 5,0 e 5,5 respectivamente.

FUKUMOTO *et alii* (11), em seus estudos sobre lipase, verificaram que a lipase de *Aspergillus niger* possuía pH ótimo de atividade em 5,6, utilizando óleo de oliva como substrato.

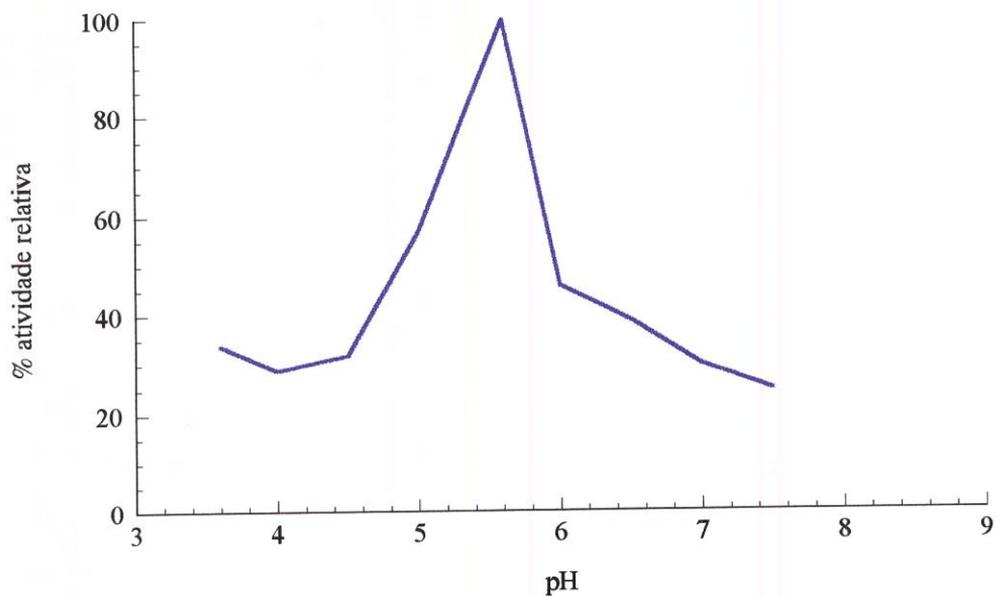
A lipase produzida por *Aspergillus flavus*, apresentou pH ótimo de atividade em 6,2, conforme relatado por HOOVER *et alii* (17) em 1973.

HOFELMANN *et alii* (16) utilizando tributirina como substrato, verificou que as lipases produzidas por *Aspergillus niger* possuíam atividade máxima em pH entre 5 a 6.

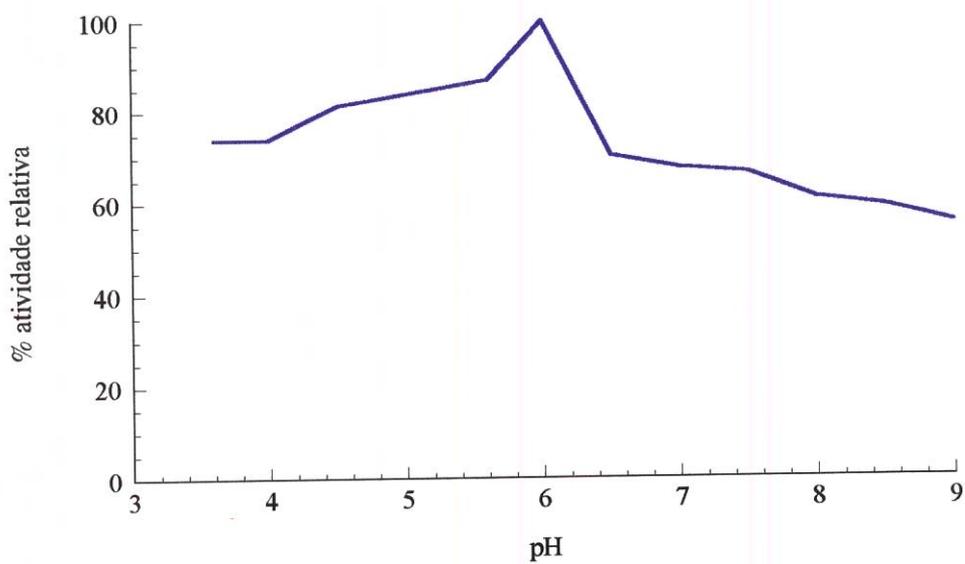
GARCIA *et alii* (12) estudaram lipase de *Aspergillus niger* que hidrolisou substrato de manteiga. As análises em HPLC, mostraram que ácidos graxos de cadeia curta foram preferencialmente hidrolisados a pH 5,0.

TOROSSIAN & BELL (59) caracterizaram uma lipase ácido resistente de *Aspergillus niger* e encontraram pH ótimo de atividade na faixa de 4,4 a 5,5.

As lipases das linhagens de *Aspergillus sp*, apresentaram pH ótimo dentro da faixa ácida de pH, como as lipases relatadas na literatura do gênero *Aspergillus*.



**Figura 5A-Efeito do pH na atividade de lipase bruta de *Aspergillus sp.* linhagem n° 1068**



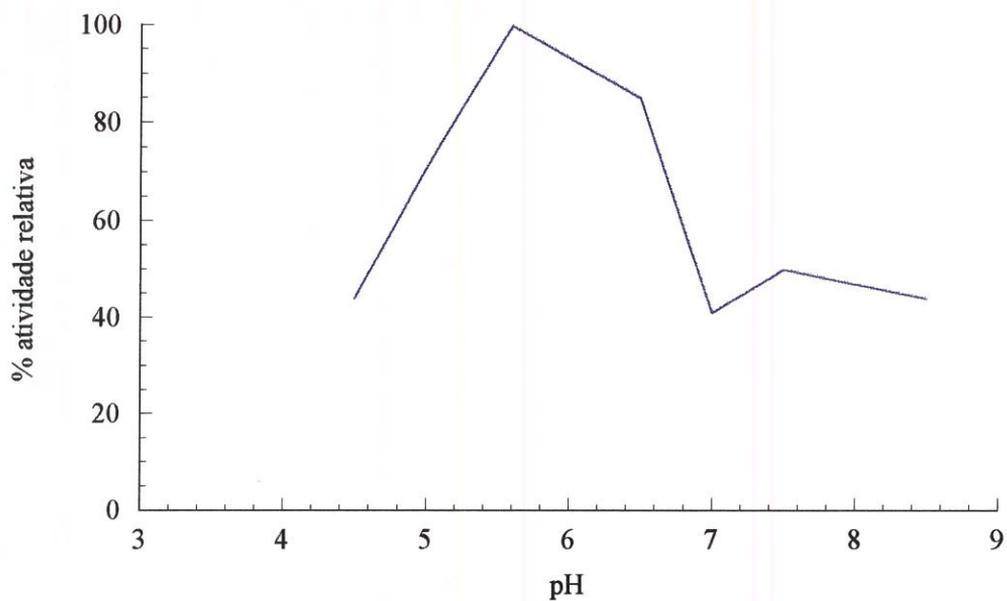
**Figura 5B-Efeito do pH na atividade de lipase bruta de *Aspergillus sp.* linhagem n° 1099**

#### 4.4.2. Efeito do pH na estabilidade da enzimas

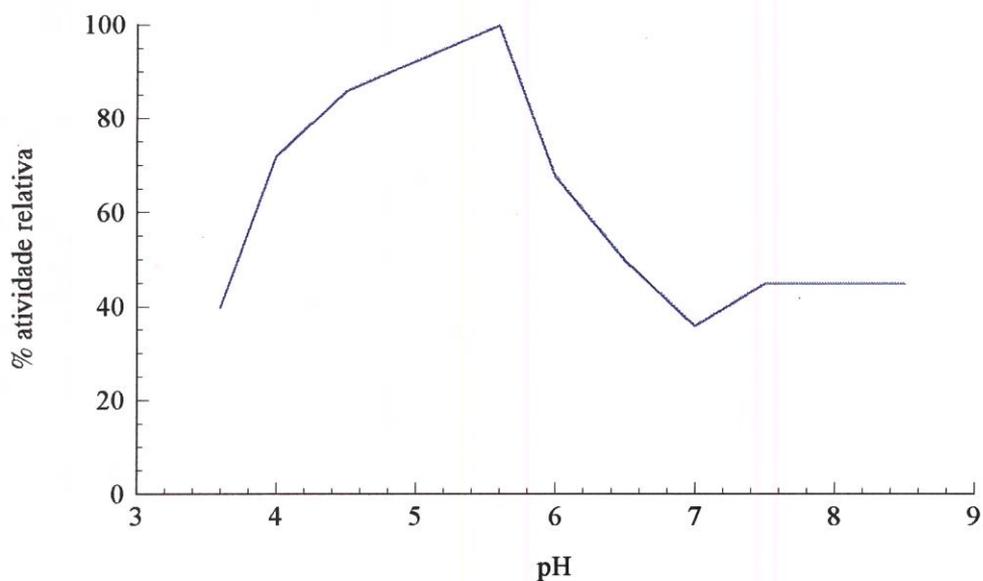
O estudo do efeito do pH na estabilidade das enzimas foi realizado como descrito no item 3.2.6.2.

As figuras 6A e 6B mostram o efeito do pH na estabilidade das enzimas. As lipases de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068 apresentou-se mais estável na faixa de pH 4,8 a 6,8, sendo inativada a pH inferiores a 4,5 ou superiores a 7,0, enquanto que a linhagem de n° 1099 apresentou-se mais estável na faixa de 4,0 a 6,2, sendo inativada a pH inferiores a 3,6 ou superiores 6,5 após 24 horas de incubação à temperatura ambiente.

FUKUMOTO *et alii* (11) analisaram as propriedades da lipase cristalizada de *Aspergillus niger* apresentando estabilidade na faixa de pH 2,2 a 6,8, após tratamento por 24 horas a 30°C.



**Figura 6A- Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta de *Aspergillus* sp- linhagem n° 1068**



**Figura 6B- Efeito do pH na estabilidade da lipase bruta de *Aspergillus* sp- linhagem n° 1099**

#### 4.4.3. Efeito da temperatura na atividade das enzimas

O estudo do efeito da temperatura na atividade das enzimas, foi realizado conforme descrito no item 3.2.6.3.

As figuras 7A e 7B apresentam os resultados obtidos. As temperaturas ótimas das lipases de *Aspergillus sp* foram 40°C e 50°C para as linhagens de número 1068 e 1099 respectivamente.

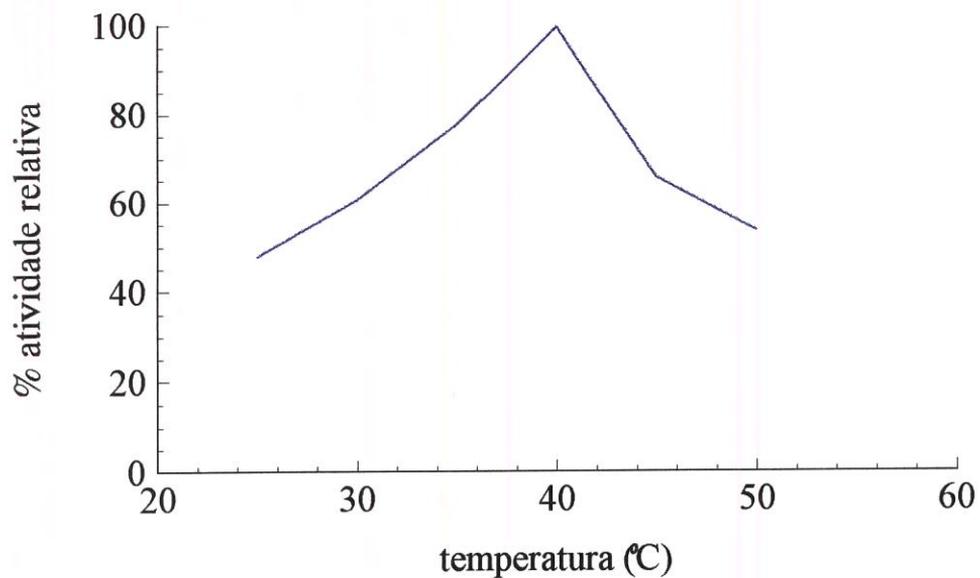
SHIPE, (54) determinou a temperatura ótima das lipases de *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger* e encontrou ser de 30 a 35°C para lipase de *Penicillium roqueforti* e 35 a 40°C para a lipase de *Aspergillus niger*.

A lipase de *Aspergillus niger* estudada por FUKUMOTO *et alii* (11) apresentou temperatura ótima de 25°C a pH 5,6.

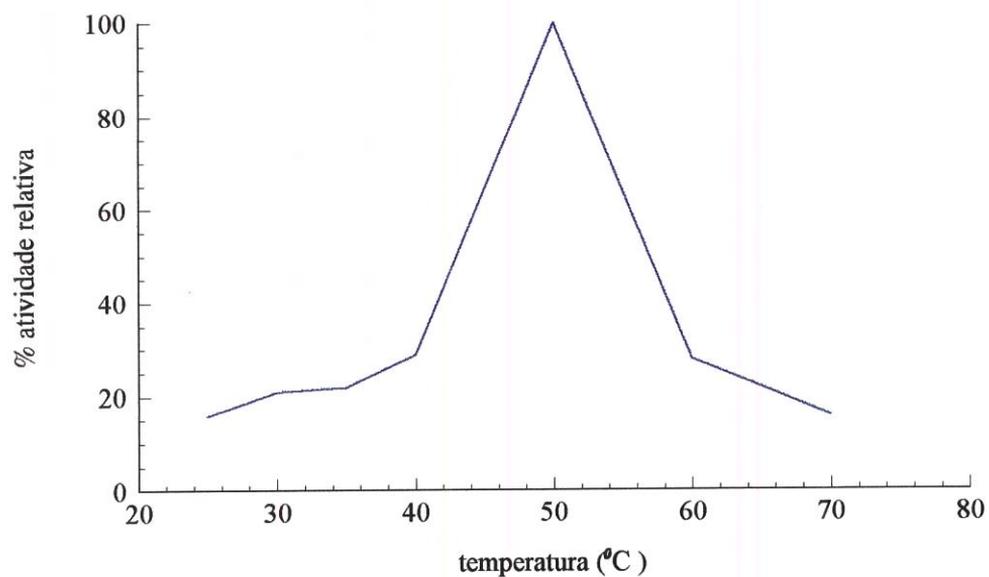
SUGIHARA *et alii* (57), purificaram e caracterizaram lipase de *Aspergillus niger*. A temperatura ótima foi de 30°C em pH 5,0.

GARCIA *et alii* (12), descreveram que a temperatura ótima para a atuação da lipase de *Aspergillus niger* foi de 35°C

A lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1099 apresentou temperatura ótima um pouco acima das relatadas por SHIPE (54), FUKUMOTO (11), SUGIHARA (57) e GARCIA *et alii*(12).



**Figura 7A-** Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta de *Aspergillus sp* -linhagem nº 1068



**Figura 7B-** Efeito da temperatura na atividade da lipase bruta de *Aspergillus sp* linhagem nº 1099

#### 4.4.4. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas

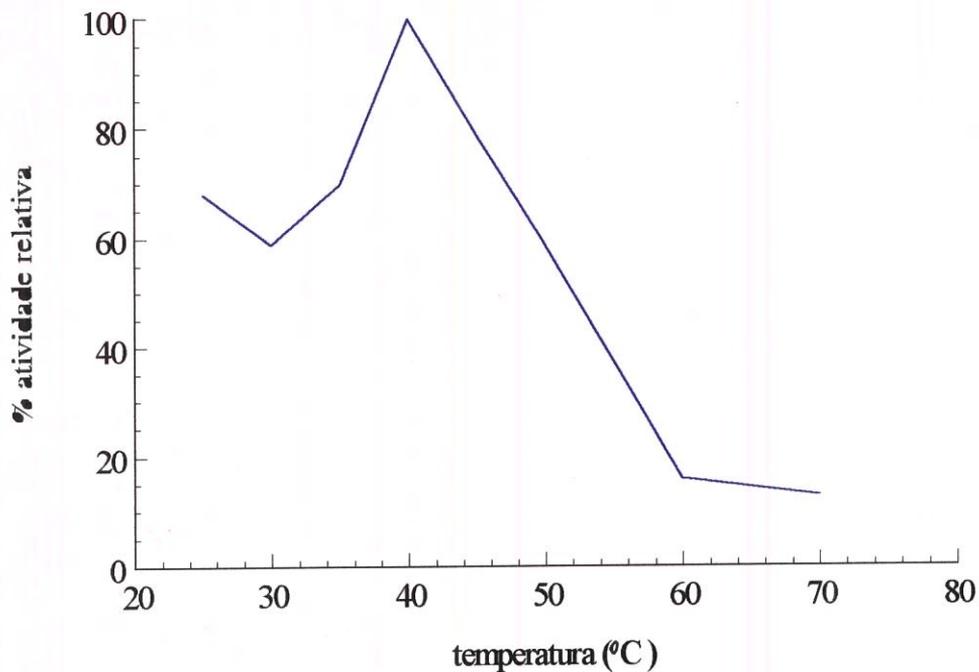
O estudo do efeito da temperatura na estabilidade das enzimas foi realizado conforme descrito no item 3.2.6.4. A lipase de *Aspergillus sp* de n° 1068, como demonstra a figura 8A e 8B, apresentou pouca estabilidade térmica, enquanto que a lipase de *Aspergillus sp* de n° 1099, reteve 60% de atividade quando tratada a temperatura de 50°C por 1 hora.

A lipase de *Aspergillus niger* descrita por FUKUMOTO *et alii* (11) não resistiu ao tratamento de 50°C por 15 minutos.

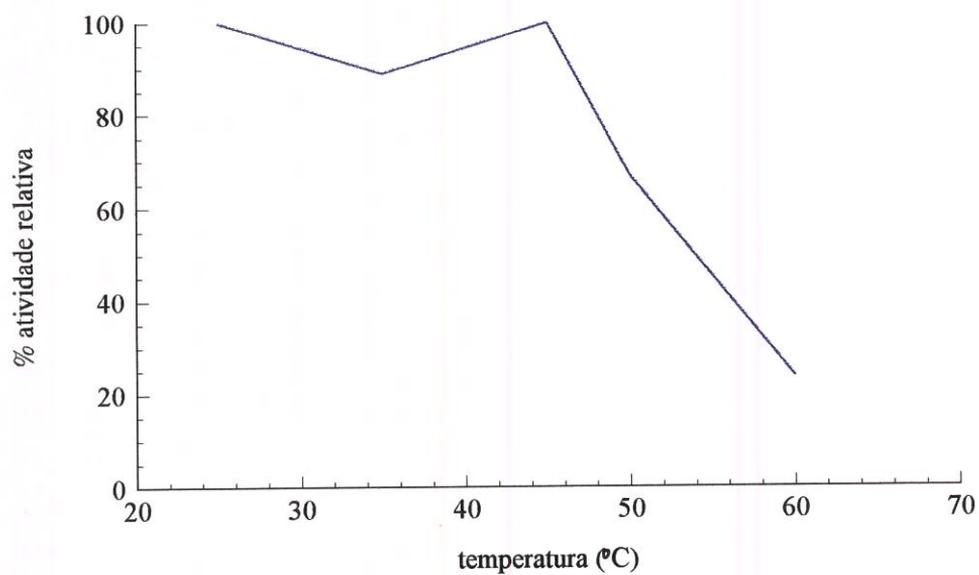
HOFELMANN *et alii*, (16) caracterizaram lipase de *Aspergillus niger* e encontraram duas lipases após o processo de purificação. Tanto a lipase I, como a lipase II, foram estáveis à temperatura abaixo de 40°C, mas perderam 40% de sua atividade após 10 minutos de incubação a 60°C e não resistiram a temperatura de 80°C.

A lipase de *Aspergillus niger* estudada por LINFIELD *et alii* (33) foi completamente sensível ao calor, sendo inativada a 52°C

A lipase da linhagem de *Aspergillus sp* n° 1099 apresentou maior estabilidade térmica que a lipase da linhagem de *Aspergillus sp* n° 1068.



**Figura 8A-** Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068



**Figura8B-** Efeito da temperatura na estabilidade da lipase bruta de *Aspergillus sp* linhagem n° 1099

#### 4.5. Estudo de composição de meio para fermentação líquida

A figura 9 mostra os resultados do estudo de composição de meio para fermentação líquida. Dentre os meios citados no item 3.2.14, as melhores composições foram as de número 3, 5, 8 e 9, sendo que a de número 9 que continha 2% de óleo de mamona, 4% de Peptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% de  $\text{NaCl}$ , 0,02% de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de extrato de levedura pH 7,0 foi a melhor composição entre as estudadas para a produção de lipase da linhagem n° 1068.

Observa-se na composição deste meio a presença de óleo de mamona como principal fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio orgânico. A combinação destes dois componentes nas concentrações utilizadas, mostraram ser eficientes na produção de lipase por fermentação líquida para a linhagem n°1068.

YAMAMOTO *et alli* (63) estudaram algumas propriedades da lipase de *Pseudomonas sp.* A bactéria produziu lipase em meio composto por 2% de óleo de mamona, 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de extrato de levedura e 0,1% de  $\text{NaCl}$ .

EITENMILLER *et alii* (9) estudaram os fatores que afetam a produção de lipase de *Penicillium roqueforti*. A lipase de *Penicillium roqueforti*, produziu máxima quantidade de lipase, quando o fungo cresceu em 0.5% casitone, 1% caldo proflo. Os resultados indicaram, que a lipase de *Penicillium roqueforti* requereu uma fonte orgânica complexa de nitrogênio para máxima produção de lipase.

TSUJISAKA *et alii* (61) compararam as propriedades de lipases fúngicas produzidas por *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Enquanto *Aspergillus niger* produziu lipase em meio semi-sólido, os outros 3 fungos produziram grande quantidade de lipase em meio semi-líquido. Este meio tinha como característica alta concentração de nitrogênio e certa quantidade de fonte de carbono.

As condições ótimas de cultura e a influência de fatores nutricionais em culturas submersas de *Aspergillus niger*, foram descritas por PAL *et alii*, (48) que relataram a importância da fonte rica em nitrogênio orgânico na produção de lipase.

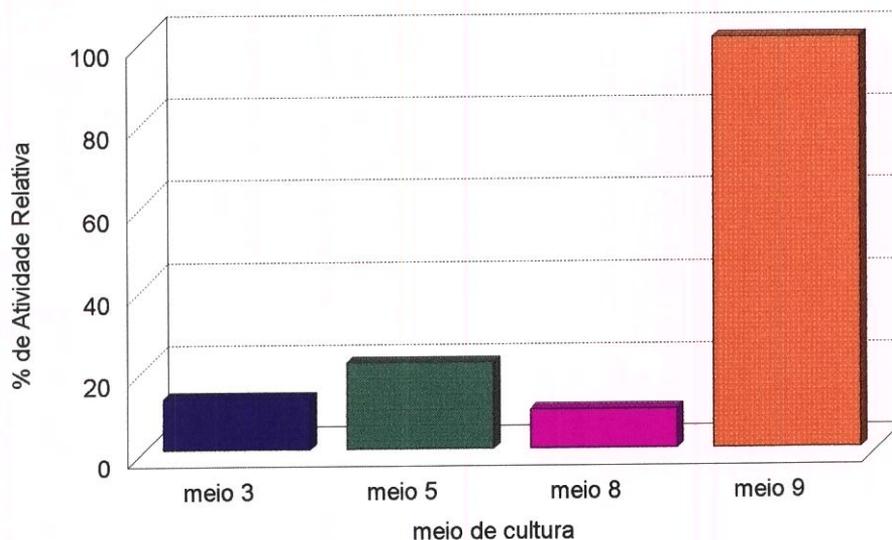
STAJER & MALESZEWSKA (58) otimizaram um meio para a produção de lipase extracelular de *Penicillium citrinum* contendo 5% peptona como fonte de nitrogênio e 2% de amido como fonte de carbono.

OKEKE & OKOLO (42) estudaram as condições necessárias para produção de lipases, por *Acremonium strictum*. Xilose foi a mais efetiva fonte de carbono para a atividade lipolítica deste microrganismo.

ESPINOSA *et alii* (10) estudaram alguns efeitos nutricionais no meio de cultura que afetam a produção de lipase de *Rhizopus delemar*. Dextrina foi a melhor fonte de carbono, quando usada ao nível de 1% e extrato de levedura foi a melhor fonte de nitrogênio na produção de lipase.

OHNISHI *et alii* (41) estudaram a produção, isolamento e purificação da lipase de *Aspergillus oryzae* e concluíram que a lipase deste microrganismo, produziu grande quantidade de lipase em meio líquido composto de: 2% glucose, 1% extrato de levedura e 2% de polipeptona.

As composições de meio estudadas para a produção de lipase por fermentação líquida, se mostraram pouco eficientes para a linhagem de *Aspergillus sp*, linhagem nº 1099.



**Figura 9. Composição de meios para fermentação líquida da linhagem n° 1068**

#### **4.5.1. Efeito da presença de óleos e gorduras como indutores de produção de lipase por fermentação líquida**

A presença de óleos e gorduras como indutores na produção de lipase, foram testados em meio líquido composto de: 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05% de extrato de levedura e 0,1% de NaCl e alguns óleos como oliva, mamona e gordura de côco na concentração de 2%. As figuras 10A e 10B trazem os resultados obtidos.

O melhor indutor foi gordura de côco para a lipase de *Aspergillus sp* n°1068 e óleo de mamona para a linhagem de n° 1099

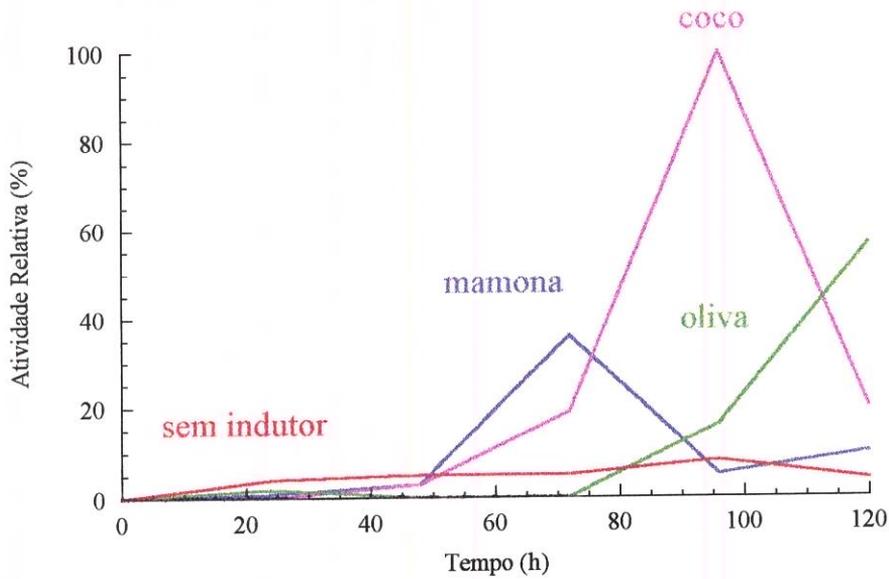
PAL *et alii* (48) descreveram as condições ótimas de cultura, e a influência de fatores nutricionais na produção de lipase em culturas submersas de *Aspergillus niger*. Os autores concluíram que gordura de manteiga e óleo de oliva quando acrescentados ao meio de fermentação, melhorou o crescimento celular e a produção da enzima.

A influência de diferentes triglicerídeos sobre a indução da lipase de *Mucor hiemalis* foi também estudada por AKHTAR *et alii* (1). Os fungos cresceram em meio contendo peptona, minerais, glucose, óleo de oliva, gordura de côco e óleo de mostarda como fonte de carbono. Dos triglicerídeos testados, o óleo de oliva foi o melhor indutor de lipase.

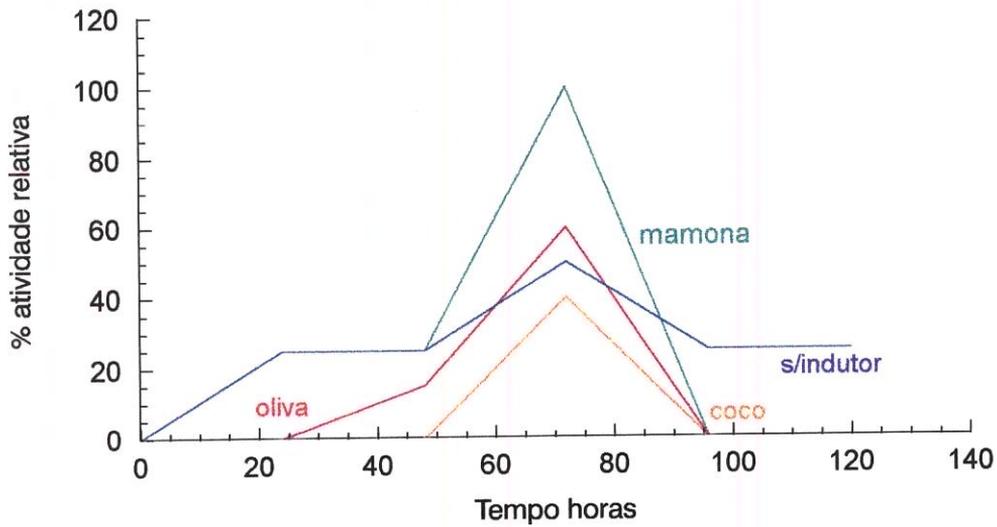
NAIR & BONE, (40) estudaram a produção de lipase de *Aspergillus foetidus* em fermentadores e investigaram as condições ótimas de cultura em meio líquido. O meio de crescimento para produção máxima de lipase por *Aspergillus foetidus* apresentou 2% de óleo de oliva e 0,5% de sacarose. Observaram também que na ausência de óleo de oliva no meio fermentativo, muito baixa atividade enzimática foi observada.

YAMAMOTO *et alii*, (63) estudaram as propriedades da lipase de *Pseudomonas sp* na hidrólise do óleo de mamona. Tanto o óleo de oliva quanto o de mamona estavam presentes no meio de cultivo, porém o óleo de oliva foi o mais efetivo para a produção de lipase.

A importância deste experimento está em mostrar os efeitos de óleos e gorduras sobre a indução na produção de lipase em meio líquido. Gordura de côco parece induzir intensamente a produção de lipase de *Aspergillus sp* n° 1068 no meio líquido estudado e óleo de mamona em menor grau, a lipase de *Aspergillus sp* n° 1099.



**Figura 10A- Efeito da presença de óleos vegetais no meio de fermentação líquida na produção de lipase de *Aspergillus sp*-linhagem nº 1068**



**Figura 10B-Efeito da presença de óleos vegetais no meio de fermentação líquida, na produção de lipase de *Aspergillus sp* linhagem nº 1099**

## **4.6. Produção e purificação parcial da lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068**

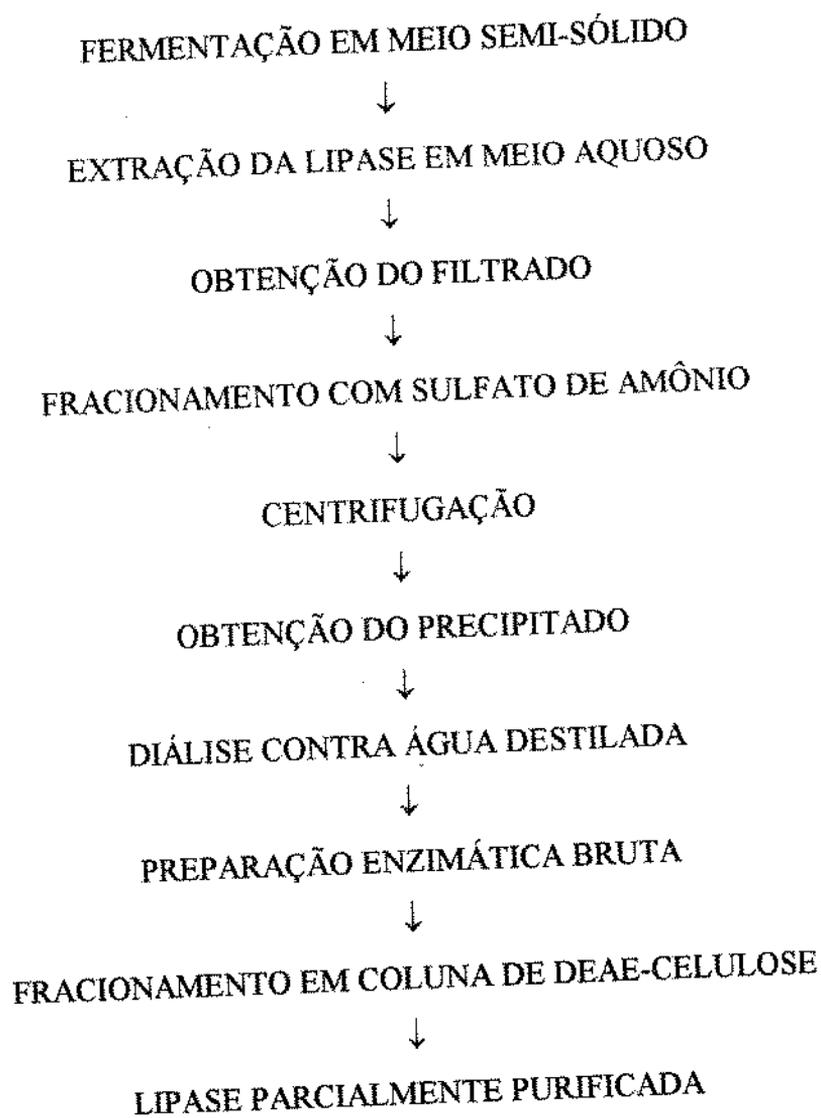
### **4.6.1. Produção de lipase**

A produção de lipase foi realizada utilizando-se fermentação semi sólida como descrito no item 3.2.4. Após a obtenção da lipase bruta, a atividade enzimática foi determinada como no item 3.2.3.4., obtendo-se 6377 unidades de atividade.

### **4.6.2. Purificação da lipase**

A purificação da lipase foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.15.

O fluxograma de purificação da lipase está descrito na figura 11



**Figura 11-Fluxograma de produção e purificação parcial de lipase de *Aspergillus sp***

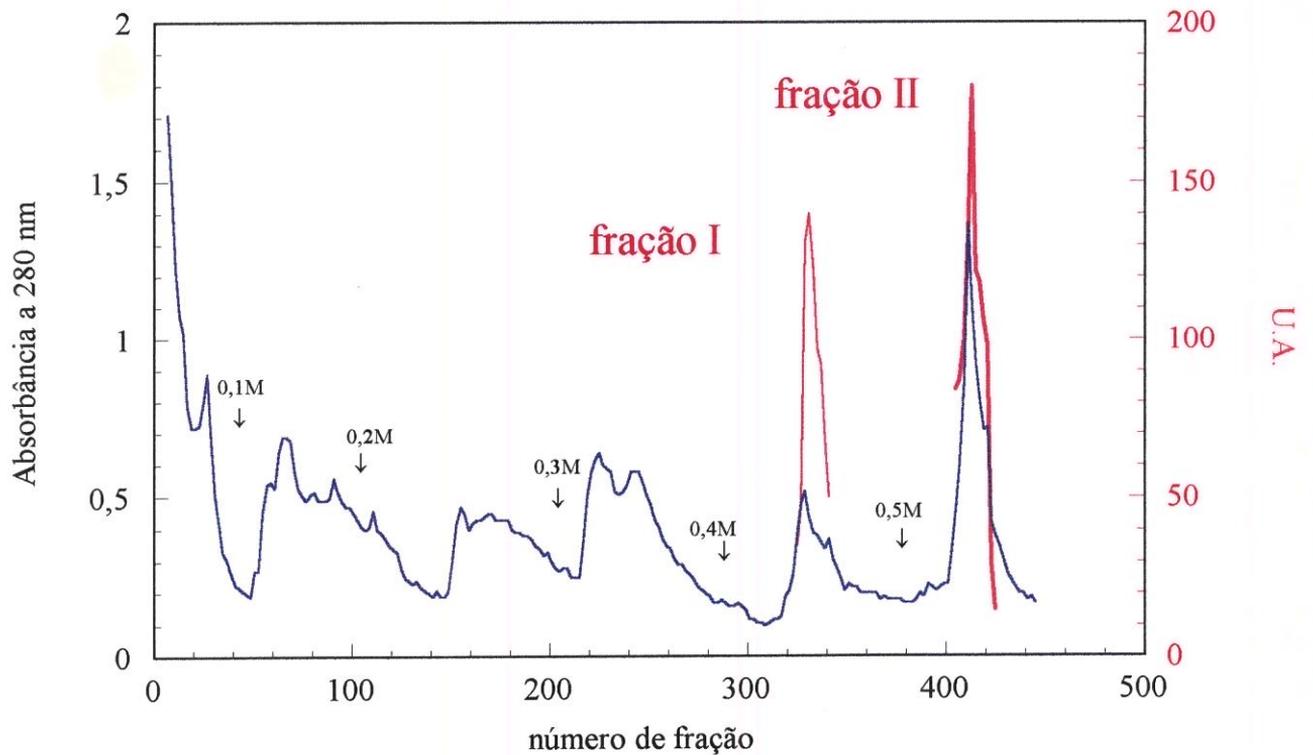
No fracionamento da preparação bruta de lipase em coluna DEAE-Celulose equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,01M , pH 8,0, a enzima adsorvida na resina foi eluída em duas frações com tampão fosfato de potássio 0,01M, pH 8.0 contendo 0,4M de NaCl e 0,5M de NaCl respectivamente. A figura 12 ilustra o fracionamento da lipase e mostra duas frações ( I e II ) com atividade lipolítica em 0,4M e 0,5M de NaCl. A purificação está sumarizada na tabela 2. A enzima foi purificada 1,5 vezes após fracionamento com sulfato de amônio. Após a cromatografia em coluna de DEAE - Celulose, a lipase foi purificada 2,8 para a F I e 1.8 vezes para F II.

FUKUMOTO *et alii*, (11) purificaram e cristalizaram uma lipase secretada por *Aspergillus niger* produzida por fermentação semi-sólida em farelo de trigo e CaCO<sub>3</sub>. O extrato bruto foi precipitado com sulfato de amônio e reprecipitado com acetona, seguido de tratamento ácido e precipitação por acrinol. Por último, o extrato foi aplicado em cromatografia de troca iônica obtendo-se a lipase pura e cristalina. Os autores verificaram na eletroforese uma única banda de proteína.

HOOVER *et alii*, (17) purificaram a lipase de *Aspergillus flavus* por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia, utilizando DEAE- celulose e Sephadex G-200. Três frações ativas foram obtidas da primeira separação, reunidas e dialisadas, e por fim, aplicadas em Sephadex G-200. A lipase de *Aspergillus flavus*, no final do processo de purificação apresentou 8,4 unidades de atividade total e foi purificada 109 vezes.

HOFELMANN *et alii*, (16) purificaram uma lipase de *Aspergillus niger*. A solução de enzima bruta, foi purificada por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE -trisacril M. Foram obtidas duas frações FI e FII com diferentes pesos moleculares, que foram recromatografadas por filtração em gel,

com resina Sephadex G50 e cromatografia hidrofóbica phenilsepharose CL-4B. Após procedimentos de purificação duas lipases foram obtidas, com pontos isoelétricos de 4 e 3,5 respectivamente.



**Figura 12- Cromatografia de lipase de *Aspergillus sp* em coluna de DEAE-Celulose**

**TABELA 2-Purificação parcial da lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068**

Etapa	Vol (ml)	Unidades (umoles p-nitrofenol / min)	Atividade total	Proteína (mg/ml)	Atividade específica (Unid/mg proteína)	Purificação (Quantidade)	Recuperação (%)
sobreoadante do meio de cultura	2270	826	1875020	20	41,3	1	100
fracionamento com sulfato amônio	7	3660	25620	56,8	64,4	1,5	1,36
cromatografia colu-na DEAE-celulose (fração I)	75	7,8	585	0,067	116,4	2,8	0,0311
cromatografia colu-na DEAE-celulose (fração II)	90	9,86	887	0,130	75,8	1,8	0,047

## 4.7. Caracterização da lipase parcialmente purificada.

As características bioquímicas da lipase produzida pela linhagem n° 1068 de *Aspergillus sp* foram determinadas como descrito no item 3.2.17, utilizando-se o substrato sintético *p*-nitrofenil-laurato(PNPL).

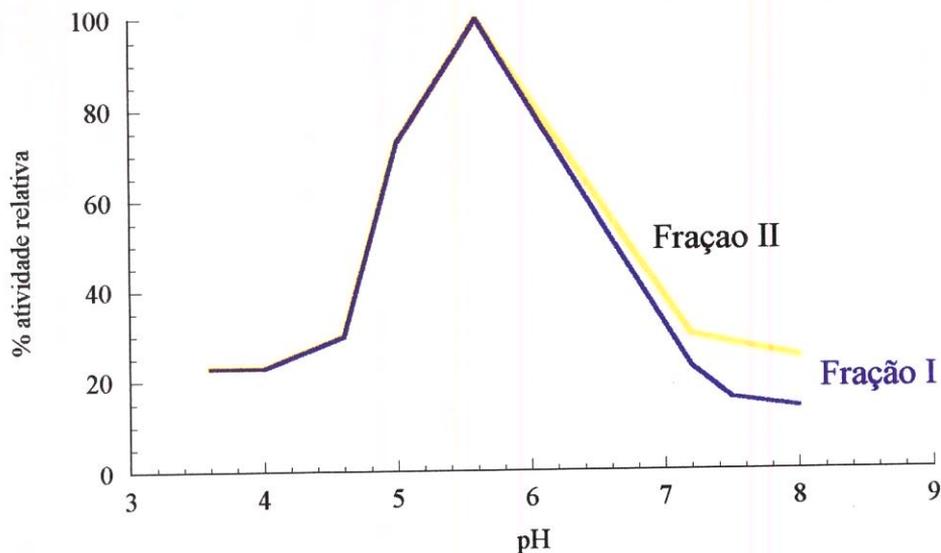
### 4.7.1 Efeito do pH na atividade da enzima

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.2.17.1.

A figura 13 mostra que as frações puras I e II de *Aspergillus sp* n° 1068 apresentaram ótima atividade em pH 5,6 em tampão acetato 0,05M.

A lipase purificada de *Penicillium cyclopium* estudada por ISOBE *et alii*, (19) foi caracterizada utilizando PNPL no meio de reação para medida de atividade enzimática. Os autores concluíram que a enzima mostrou máxima atividade em pH 6,0 em tampão fosfato de potássio.

As enzimas de *Aspergillus niger* estudadas por SHIPE (54), FUKUMOTO *et alii* (11), HOFELMANN *et alii* (16), TOROSSIAN & BELL (60), SUGIHARA *et alii* (57), apresentaram pH ótimo de atividade em 5,5 ,5,6 5-6, 4,4-5,5 e 4,5-5,5, respectivamente. A lipase produzida por *Aspergillus flavus*, descrita por HOOVER *et alii* (17) apresentou pH ótimo de atividade em 6,2.



**Figura 13-Efeito do pH na atividade da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus sp.*-linhagem nº 1068**

#### 4.7.2. Efeito do pH na estabilidade da enzima

O estudo da influência do pH na estabilidade enzimática foi realizado de acordo com o item 3.2.17.2.

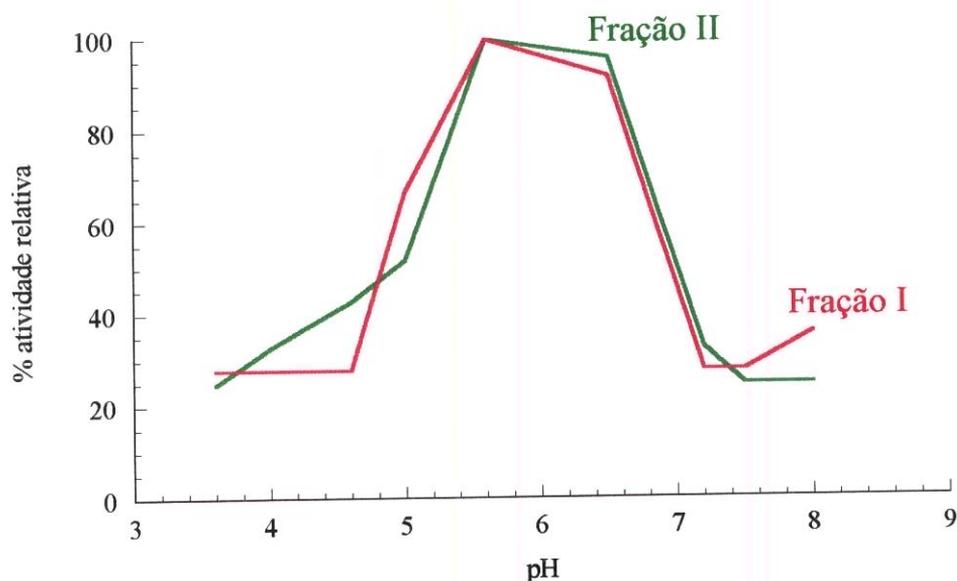
A figura 14 ilustra o efeito do pH na estabilidade da enzima. As frações I e II, apresentaram-se mais estáveis na faixa de pH entre 5 a 7, sendo inativada a pH inferiores a 5 após 24 horas de incubação a 30°C.

Lipases produzidas por *Aspergillus niger*, estudadas por FUKUMOTO *et alii* (11) apresentaram pH de estabilidade na faixa de 2,2 a 6,8 após tratamento por 24 horas a 30°C.

A lipase de *Penicillium cyclopium*, caracterizada por ISOBE *et alii* (19) apresentaram estabilidade em pH na faixa de 4,5 a 6,0 após incubação a 37°C por 30 minutos.

IWAI & TSUJISAKA (21) estudaram a purificação e as propriedades de 3 tipos de lipases de *Rhizopus delemar*. A lipase A é estável em

torno de pH 3,0 a 8,0 enquanto lipases **B** e **C** foram estáveis em torno de pH 4 a 7.

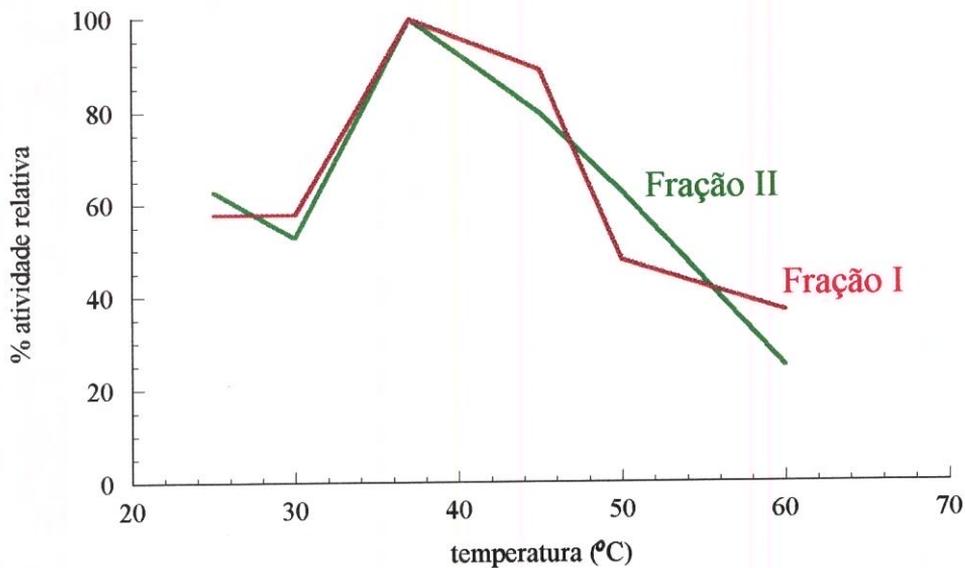


**Figura 14- Efeito do pH na estabilidade da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus sp*- linhagem n°1068**

#### **4.7.3. Efeito da temperatura na atividade da enzima.**

O efeito da temperatura na atividade da lipase foi determinado de acordo com o método descrito no ítem 3.2.17.3. A figura 15 mostra que a lipase de *Aspergillus sp* n° 1068 parcialmente purificada apresentou temperatura ótima a 37°C.

ISOBE *et alii* (19) caracterizaram a lipase de *Penicillium cyclopium* em substrato sintético PNPL e encontraram que a lipase apresentou temperatura ótima a 40°C.



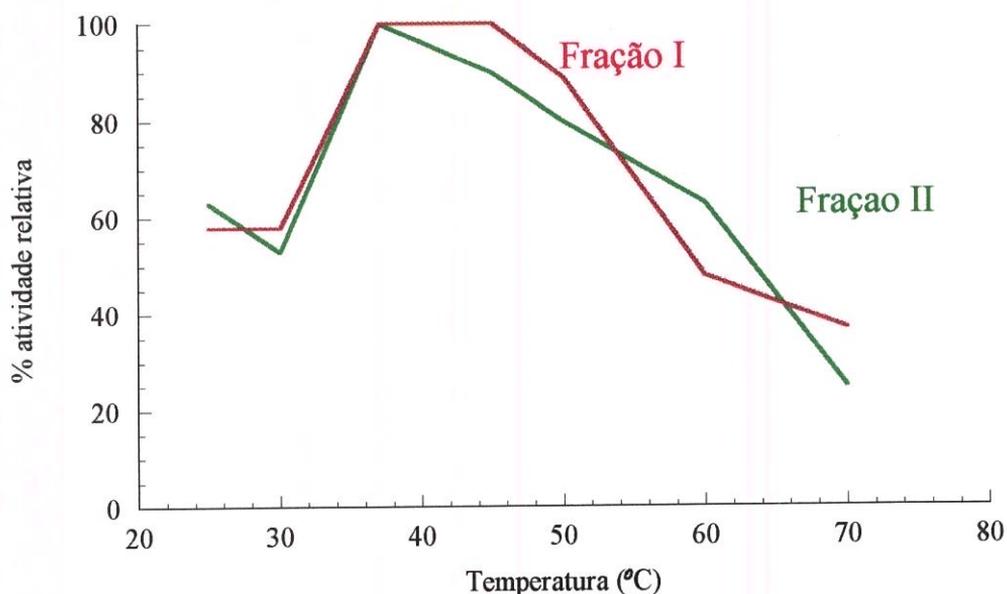
**Figura 15- Efeito da temperatura na atividade da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus sp*- linhagem nº1068**

#### **4.7.4. Estabilidade térmica da enzima**

O estudo referente ao efeito da temperatura na estabilidade da lipase foi realizado de acordo com as condições descritas no item 3.2.17.4. A figura 16 ilustra os resultados obtidos. Quando a lipase purificada de *Aspergillus sp* foi tratada nas temperaturas de 25°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C e 60°C, verificou-se que as frações parcialmente puras retiveram mais de 80% de atividade quando tratadas a 50°C por 1 hora.

Dentre as lipases fúngicas descritas por TSUJISAKA *et alii*, (61) as lipases produzidas por *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopim*, apresentaram termoestabilidade a 50, 65, 45-50, e 40°C respectivamente, quando tratadas por 15 minutos em pH 5,6.

As propriedades de 3 tipos de lipases de *Rhizopus delemar* foram descritas por IWAI & TSUJISAKA (21). A lipase B e C purificada foram estáveis abaixo de 45°C, enquanto que a lipase A foi estável até 60°C



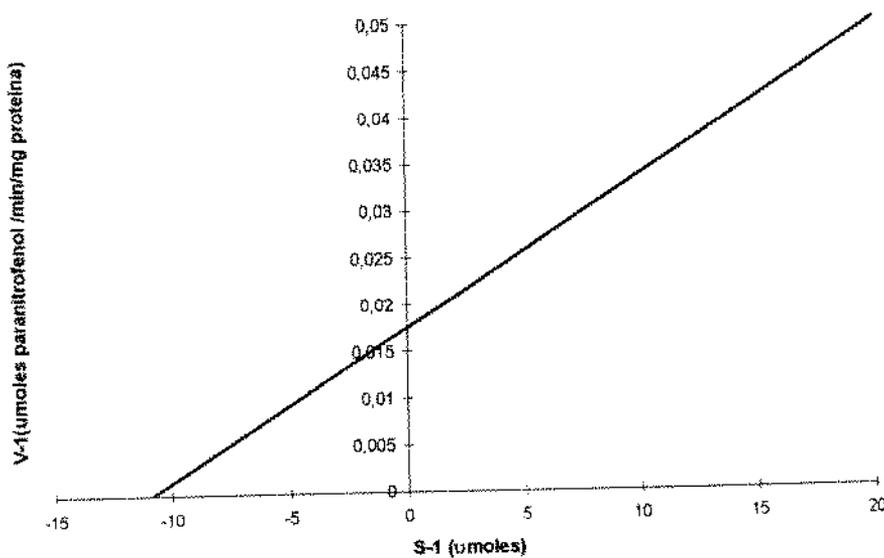
**Figura 16- Efeito da temperatura na estabilidade da lipase parcialmente purificada de *Aspergillus sp*- linhagem nº 1068**

#### **4.7.5. Efeito da concentração do substrato na atividade enzimática**

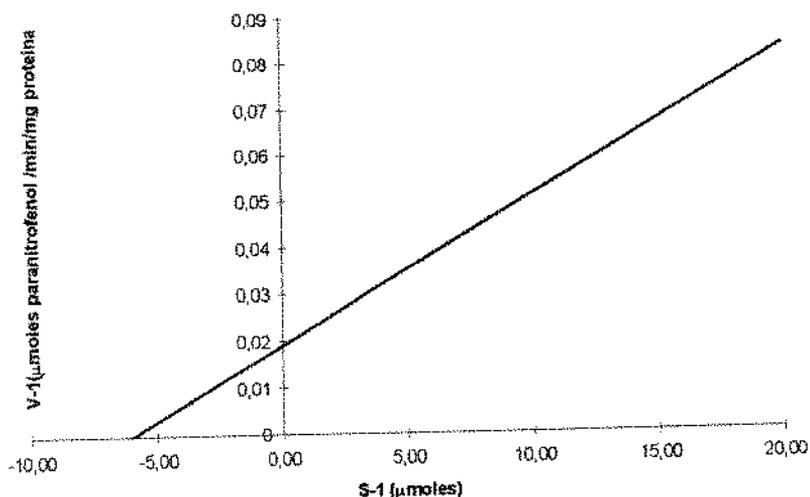
O efeito da concentração do substrato PNPL na atividade de lipase de *Aspergillus sp* nº 1068 foi determinado de acordo com as condições descritas no item 3.2.17.5. Os resultados estão ilustrados respectivamente nas figuras 17A e 17B. A constante de Michaelis-Mentem ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) foram determinadas de acordo com o sistema gráfico de LINEAWER & BURK (32), obtendo-se os valores de  $K_m$  0,092 mmoles e  $V_{max}$  56,98  $\mu$ moles de paranitrofenol/min/mg de proteína para o substrato paranitrofenil-laurato para

fração I e  $K_m$  0,16mmoles e  $V_{max}$  52,11  $\mu$ moles de paranitrofenol/min/mg para a fração II.

HOOVER *et alii*, (17) no estudo das propriedades da lipase fúngica que hidrolisou óleo de côco, determinou  $K_m$  em trilaurina e tributirina encontrando  $9,09 \times 10^{-4}$  e  $1,43 \times 10^{-3}$  M respectivamente.



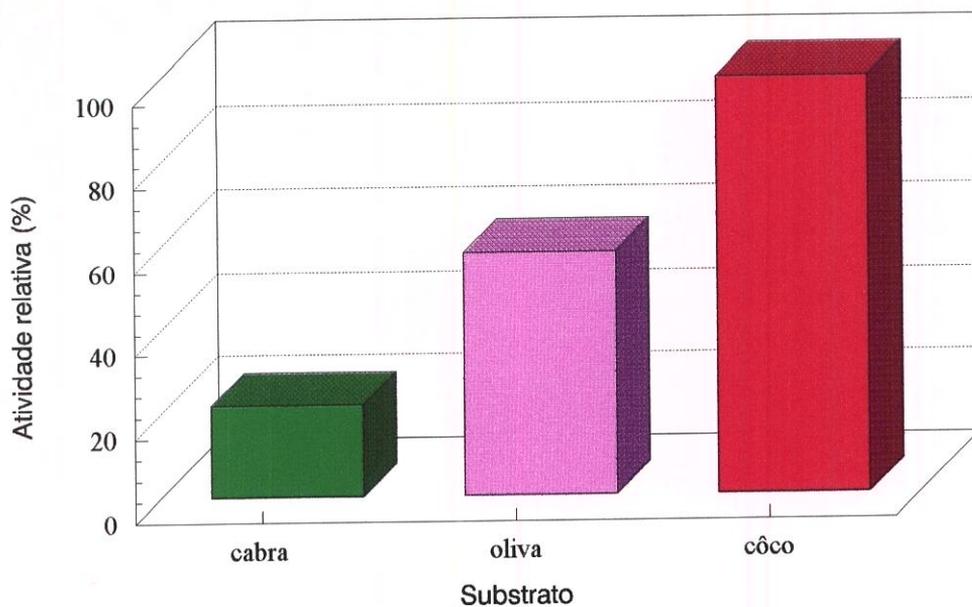
**Figura 17A-** Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil-laurato na atividade de lipase para F I.



**Figura 17B- Efeito da concentração do substrato *p*-nitrofenil-laurato na atividade de lipase para F II.**

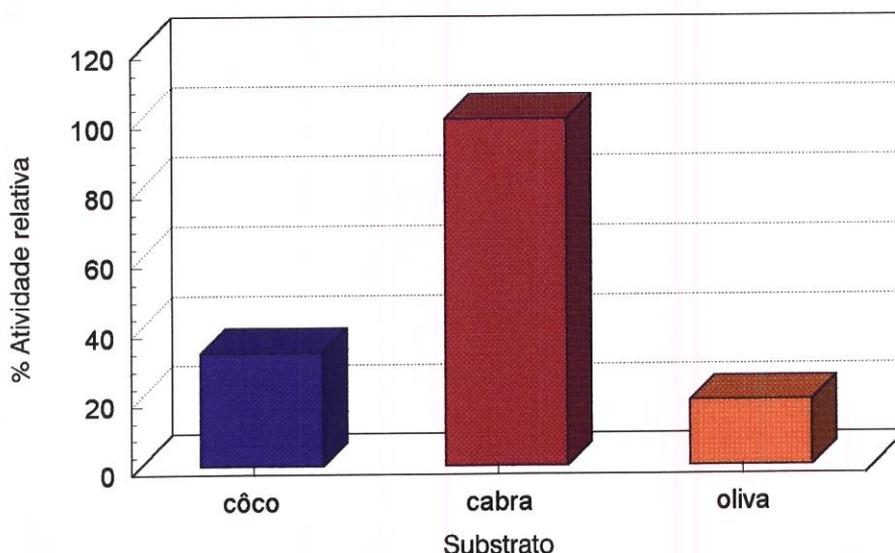
#### **4.7.6 Hidrólise de glicerídeos pela lipase de *Aspergillus sp***

A hidrólise de glicerídeos pelas lipases de *Aspergillus sp* n° 1068 e n° 1099 foi realizada de acordo com o método descrito no item 3.2.7, 3.2.8 e 3.2.9. A figura 18A mostra a ação da lipase sobre os diferentes triglicerídeos testados. A enzima apresentou melhor atividade em gordura de côco, óleo de oliva e gordura de leite de cabra em ordem decrescente.



**Figura 18A Ação da lipase de *Aspergillus sp* linhagem n°1068 sobre triglicerídeos**

Por outro lado a lipase de *Aspergillus sp* n° 1099 apresentou melhor atividade em gordura de leite de cabra, gordura de côco e óleo de oliva na mesma ordem, como ilustra a figura 18B.



**Figura 18B- Ação da lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1099 sobre triglicerídeos**

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

A lipase de *Aspergillus niger* estudada por FUKUMOTO *et alii* (11) hidrolisou completamente o óleo de oliva, este fato indicou que a enzima pode atacar não somente a ligação do éster primário no triglicerídeo, mas também a posição secundária.

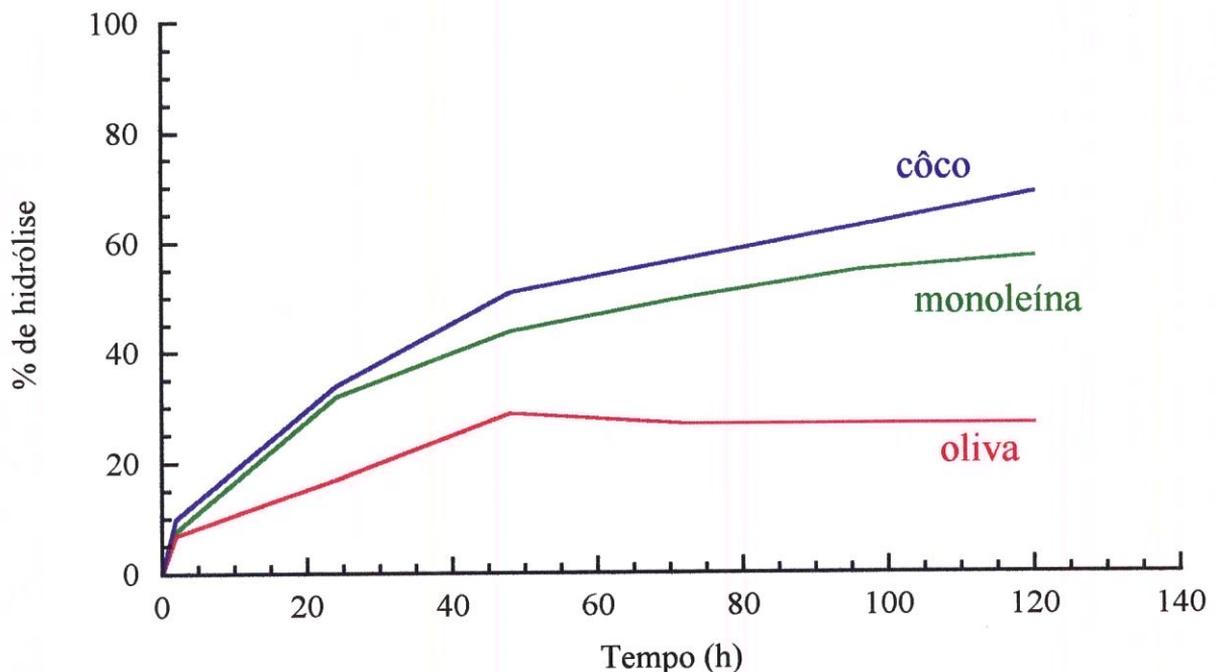
HOOVER *et alii* (17) isolaram uma linhagem de *Aspergillus flavus* que hidrolisou óleo de côco, com a liberação de ácidos graxos livres. Os ácidos

graxos de cadeia curta dos triglicerídeos foram hidrolisados mais rapidamente que os de cadeia longa.

A lipase produzida por *Mucor hiemalis*, foi estudada por AKHTAR *et alii* (1). Os autores concluíram que a lipase foi mais ativa em triglicerídeo de óleo de côco. O óleo emulsificado não interferiu na especificidade.

A lipase de *Aspergillus niger* caracterizada parcialmente por GARCIA *et alii*, (12) hidrolisou substrato de manteiga emulsionado. Os ácidos graxos de cadeia curta foram liberados como produto de hidrólise.

A figura 18C mostra a porcentagem de hidrólise dos substratos óleo de oliva, monoleína comercial e gordura de côco, demonstrando que a lipase de *Aspergillus sp* hidrolisou em ordem crescente, óleo de oliva, monoleína e gordura de côco.

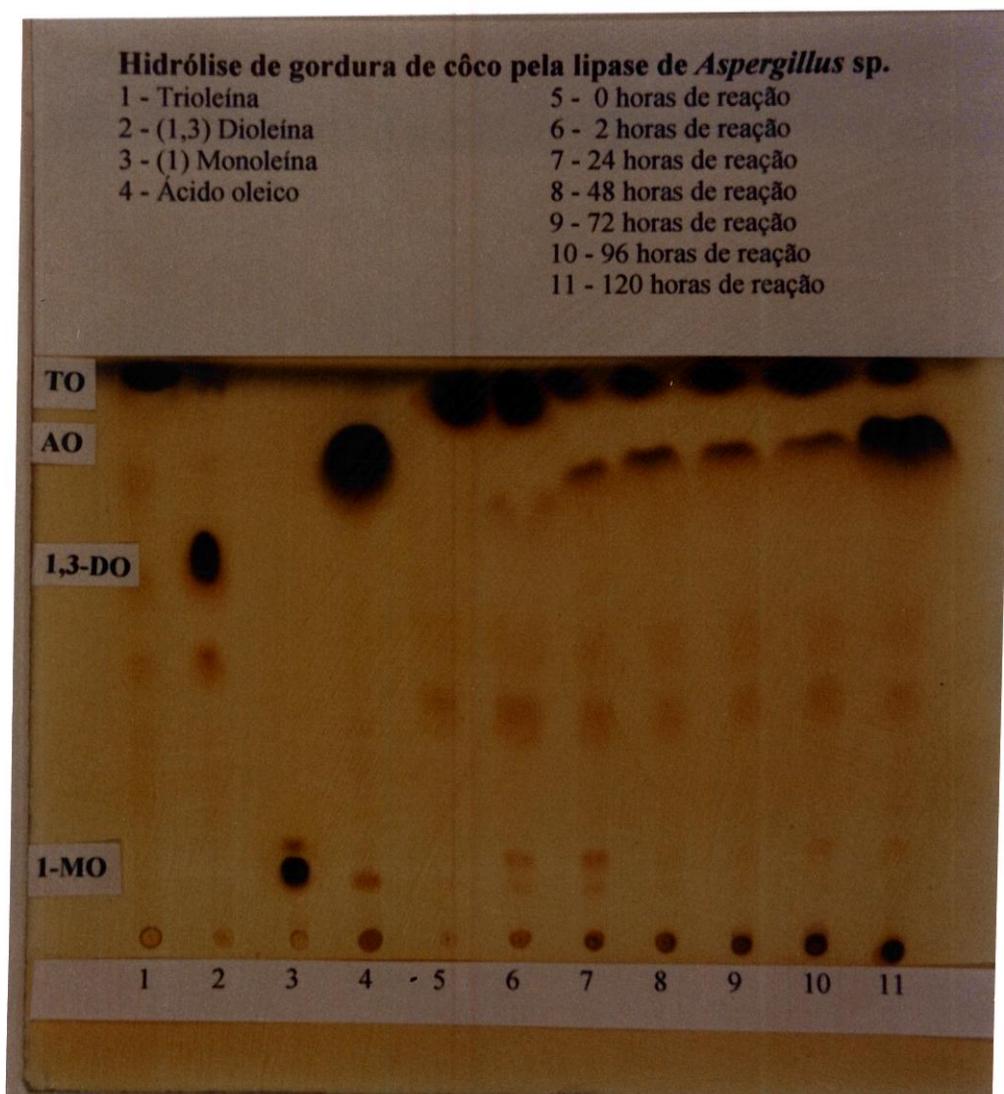


**Figura 18C- Efeito do tempo de reação na hidrólise enzimática por lipase de *Aspergillus sp*- linhagem n° 1068**

A lipase bruta de *Aspergillus sp* n° 1068 hidrolisou em 40 h de reação o triglicerídeo de gordura de côco. A máxima porcentagem de hidrólise foi de 69%, em 120 h de reação. O grau de hidrólise da mesma lipase foi maior em monoleína quando comparado ao substrato óleo de oliva. Em 48 h de reação, a lipase hidrolisou 44% de monoleína e apenas 29% em óleo de oliva.

LINFIELD *et alii* (33) estudaram a cinética de hidrólise em banha, gordura de côco e óleo de oliva, utilizando as lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. As duas primeiras lipases foram capazes de hidrolisar todos os três substratos em 72 h.

A figura 18D ilustra a Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos da hidrólise de gordura de côco por ação da lipase bruta de *Aspergillus sp* n° 1068, indicando que nos estágios iniciais da hidrólise há formação de dois tipos de monoglicerídeos e diglicerídeos. A produção de ácido oleico aumentou progressivamente até 120 h de reação.



**Figura 18D- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos da hidrólise de gordura de côco por ação da lipase bruta de *Aspergillus sp* n° 1068**

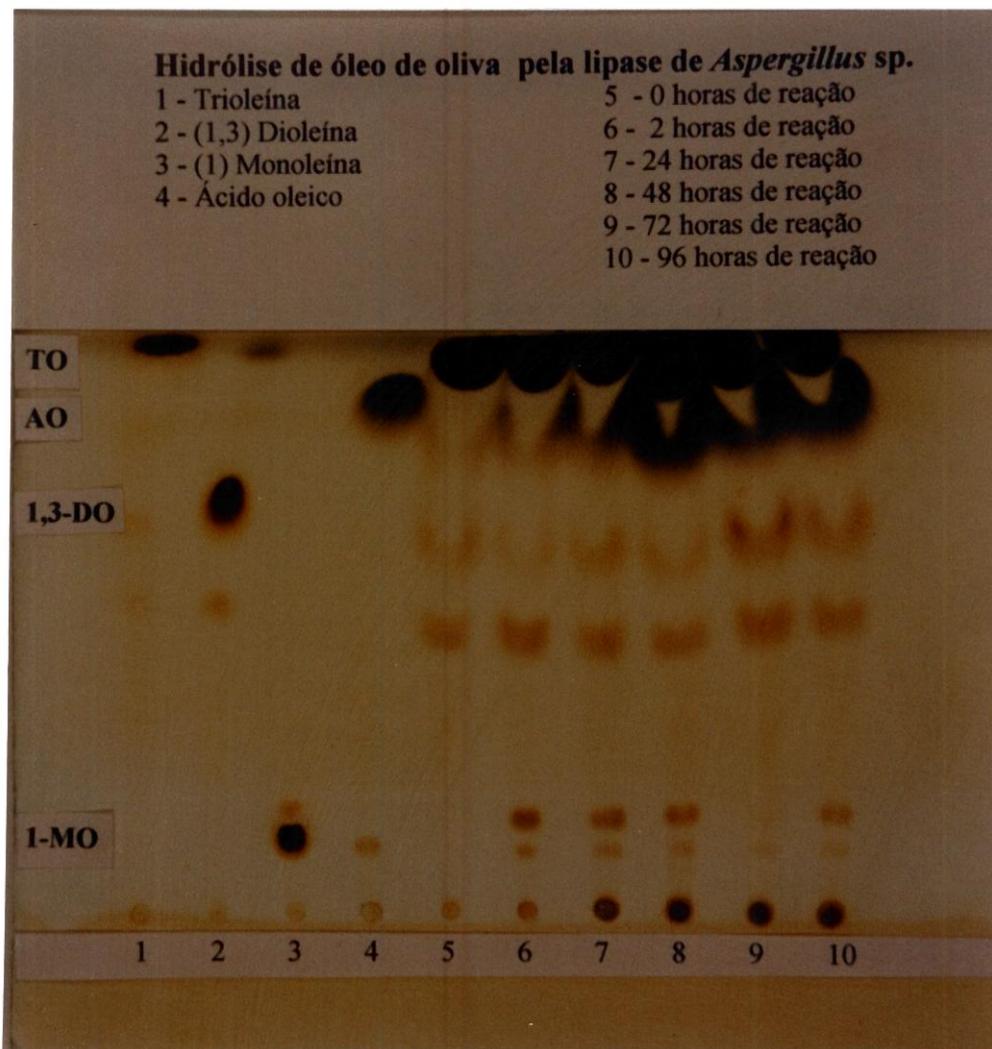
**TO - Trioleína**

**AO - Ácido oleico**

**1,3- DO - (1,3) Dioléina**

**1- MO- (1) Monoléina**

A figura 18E ilustra a Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos da hidrólise de óleo de oliva pela lipase de *Aspergillus sp* n° 1068, indicando a formação inicial de monoglicerídeos e dois tipos de diglicerídeos. A hidrólise após 96 horas mostrou um aumento na concentração final de ácido oleico.



**Figura 18E-Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos da hidrólise de óleo de oliva pela lipase de *Aspergillus sp* n° 1068**

**TO - Trioleína**

**AO - Ácido oleico**

**1,3- DO - (1,3) Dioleína**

**1-MO-(1) Monoleína**

TAHOUN *et alii*, (59) estudaram uma lipase intracelular de *Aspergillus niger*. Os autores observaram após, 15 min de hidrólise de triglicerídeos de gordura de leite, 9,5% de monoglicerídeos e 13,8% de diglicerídeos como produtos finais. A produção máxima de ácidos graxos livres foi detectada após 30 min de reação.

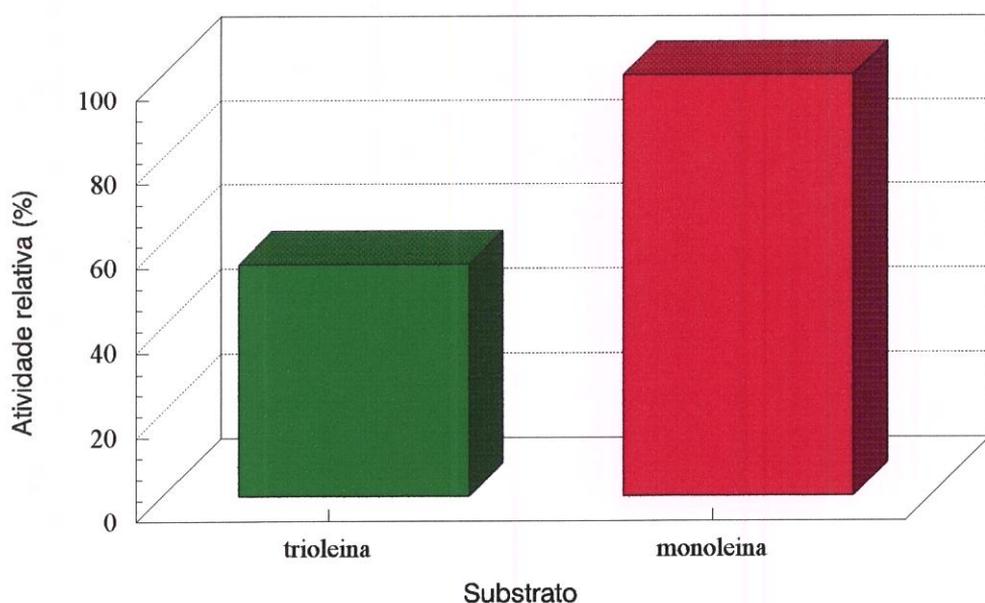
TOROSSIAN & BELL, (60) obtiveram como produtos da hidrólise da lipase de *Aspergillus niger*, ácido oleico, 1,2-dioleína, 1-monoleína e 2-monoleína. A lipase de *A. niger* segundo os autores é específica e hidrolisa as ligações ésteres dos triglicerídeos nas posições 1 e 3.

ALFORD & PIERCE, (2) mediram a atividade lipolítica de linhagem como *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus aureus*, *Geotrichum candidum*, *Candida lipolytica*, *Penicillium roquerforti* e *Penicillium sp*, em emulsões de óleo de côco, óleo de milho e toucinho. Os autores relataram que o óleo de côco, foi o primeiro a ser hidrolisado dentre os três substratos para todas as lipases e encontraram diferenças básicas entre as lipases microbinas de diferentes origens. Estas enzimas foram ativas à baixas temperaturas, e sua atividade foi determinada pelo tipo e posição do ácido graxo no triglicerídeo.

#### **4.7.6.1 Estudo da especificidade da enzima bruta de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068**

O estudo da especificidade da lipase de *Aspergillus sp*, linhagem n° 1068 foi realizado através de padrões de trioleína e monoleína de acordo com o descrito no item 3.2.11. A lipase mostrou ser mais ativa sobre monoleína do que sobre trioleína. A figura 19 ilustra os resultados obtidos.

A lipase de *Penicillium cyclopium* M1, foi considerada por OKUMURA *et alii* (46) uma hidrolase parcial glicérido, baseada na especificidade do substrato. A enzima foi mais específica para glicéridos parciais do que para triglicéridos. Monoglicéridos contendo ácidos graxos de cadeia média, especialmente monocaprina, monocaprina, monolaurina, e monoleína, foram mais rapidamente hidrolisados do que triglicéridos de mesma cadeia.



**Figura 19- Ação da lipase de *Aspergillus sp*, linhagem n° 1068 sobre os substratos trioleína e monoleína.**

#### **4.8 Determinação de carboidratos totais presentes na lipase de *Aspergillus sp* linhagem nº 1068**

O teor de carboidratos totais presentes na lipase parcialmente purificada de *Aspergillus sp* nº 1068 foi determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (8) de acordo com o item 3.2.12. Os conteúdos de carboidratos totais encontrados foram 5% e 7.8% para a fração I e II respectivamente. As lipases relatadas na literatura possuem carboidratos em sua composição, com conteúdo variável como indicam os seguintes relatos:

IISHIHARA *et alii* (18) encontraram o teor de 2,6% de carboidratos na lipase purificada de *Mucor javanicus*.

SUGIHARA *et alii* (57) encontraram o teor de 7,0% de carboidratos na lipase purificada de *Aspergillus niger*.

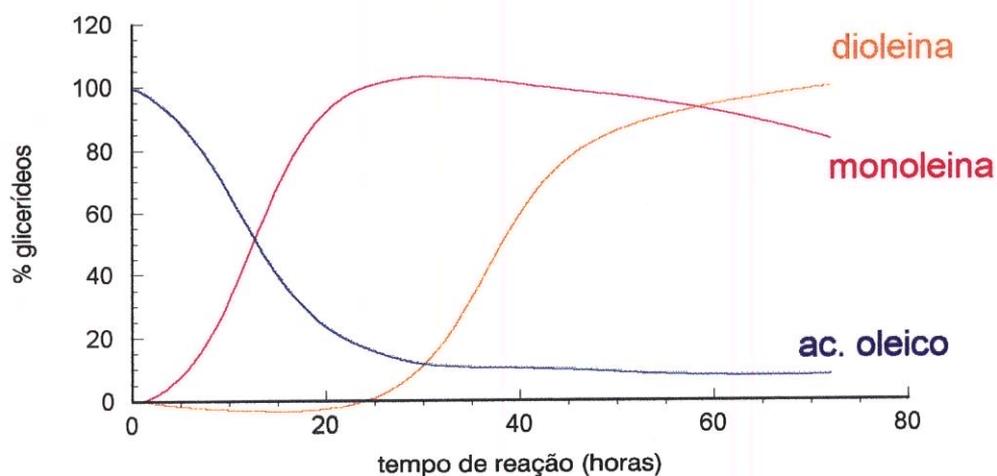
HOFELMANN *et alii*, (16) obtiveram duas frações purificadas de *Aspergillus niger* encontrando 6,0 e 9,0% respectivamente de carboidratos totais.

PASTORE & PARK (50), no estudo de produção e caracterização bioquímica de lipase microbiana encontraram o conteúdo de 7,75% de carboidratos totais na lipase de *Trichoderma sp*

#### **4.9 Estudo da ação de esterificação pela lipase de *Aspergillus sp* nº 1068**

O estudo da produção de ésteres através da esterificação de ácido oleico e glicerol foi realizado utilizando-se lipase de *Aspergillus sp* nº 1068 de acordo com o item 3.2.18

A figura 20A mostra a composição percentual dos glicerídeos formados por esterificação enzimática. Através da figura observa-se que 100% de monoleína é formada após 24 horas de reação e 83% de dioleína é formada após 48 horas de reação.

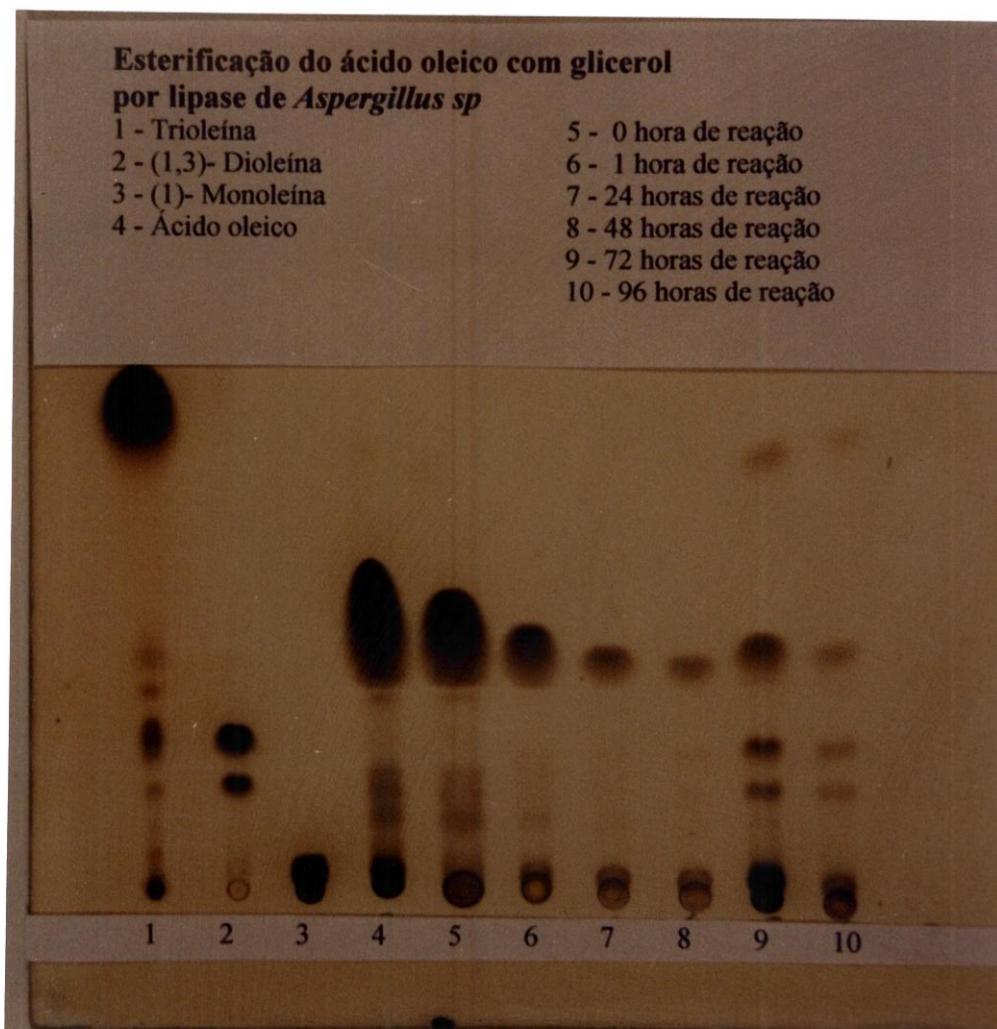


**Figura 20A- Composição percentual dos glicerídeos formados por esterificação enzimática**

**sistema de reação composto de glicerol: ácido oleico na proporção 40:1(v/p)**

A figura 20B mostra o cromatograma em Camada Delgada, indicando curso da reação de esterificação enzimática do ácido oleico com glicerol pela lipase de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068. Através da figura pode-se observar o consumo de ácido graxo e consequentemente a formação de monoleína, dioleína e uma pequena fração de trioleína após 72 horas de reação. Os resultados estão de acordo com TSUJISAKA et alii, (62) que estudaram as melhores condições para síntese de glicerídeos por quatro tipos de lipases microbianas obtidas de *Aspergillus niger* NRRL, *Rhizopus delemar* ATCC, *Geotrichum candidum* ATCC e *Penicillium cyclopium* ATCC. Os autores detectaram como produtos de reação 1( 3)monoleína e 1,3 dioleína para as

enzimas de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* nos estágios iniciais da reação, quando foi utilizado ácido oleico como substrato. Após longo período de tempo, pequena quantidade de 1,2 (2,3) dioleína e trioleína foram detectados.



**Figura 20B- Cromatografia em Camada Delgada (TLC) dos produtos de esterificação.**

**Sistema composto de glicerol:ácido oléico na proporção 40:1 (v/p)**

OKUMURA *et alii*, (47) estudaram o efeito da ação reversa na hidrólise de triglicerídeo. Foram utilizadas lipases purificadas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium cyclopium*. Os autores concluíram que embora lipase de *Aspergillus niger* não hidrolisou a ligação éster na posição 2 do triglicerídeo, a hidrólise procedeu gradualmente acima de 70%. Isto explicou o fato da lipase de *Aspergillus niger* não ser tão ativa na reação de esterificação.

LINFIELD *et alii*, (33) estudaram a esterificação do ácido oleico com glicerol pelas lipases de *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus arrhizus*. Os autores concluíram que *C. rugosa* e *A. niger* apresentaram resultados semelhantes entre si. A esterificação foi lenta e somente após 6 semanas de reação 80% dos grupos hidroxilas foram esterificados. A análise em cromatografia delgada após este período de tempo mostrou 1,4% de monoglicerídeos, 19,8% de diglicerídeos, 43,6% de triglicerídeos e 35,3% de ácidos graxos .

## 5. CONCLUSÕES

1- Das 689 linhagens isoladas e testadas, as linhagens n° 1068 e n° 1099 foram selecionadas por apresentarem maior atividade de lipase e atividade lipolítica diferenciada quanto ao substrato. Estas linhagens foram identificadas como *Aspergillus sp.*

2- As lipases de *Aspergillus sp* n° 1068 e n° 1099 produzem lipase extracelular e hidrolisam preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia média-longa (C12- C18) e cadeia curta (C8) respectivamente

3- A produção máxima de enzima foi obtida por fermentação semi- sólida em meio de cultivo composto de farelo de trigo e água na proporção de 1:1 (p/p). O acréscimo de cloreto de cálcio ao meio de cultivo e solução de minerais não aumentaram a produção de lipase.

4- A lipase bruta de *Aspergillus sp* linhagem n° 1068, apresentou atividade ótima em pH 5,6 em óleo de oliva , sendo estável na faixa de pH entre 5,0-7,0. A temperatura ótima foi de 40°C. A lipase de *Aspergillus sp* linhagem n°1068 apresentou baixa estabilidade térmica. A lipase bruta de *Aspergillus sp* linhagem n°1099 apresentou atividade ótima em pH 6,0 em gordura de leite de cabra, sendo estável na faixa de pH entre 4,0-6,2. A temperatura ótima foi de 50°C. Quanto à estabilidade, a lipase de *Aspergillus sp* linhagem n°1099 apresentou-se estável em temperatura inferiores a 50°C por 1 hora.

5- A melhor composição de meio para fermentação líquida foi dada por 2% de óleo de mamona, 4% de polipeptona, 0,1% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1% de  $\text{NaCl}$ , 0,02% de

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 0,05% de extrato de levedura para a linhagem n° 1068. Para linhagem n° 1099 nenhuma composição testada mostrou ser eficiente para produção de lipase por fermentação líquida.

6- Verificou-se que, gordura de côco foi o melhor indutor para a produção de lipase de *Aspergillus sp* linhagem n°1068 por fermentação líquida e óleo de mamona foi para a lipase de *Aspergillus sp* linhagem n°1099.

7- A lipase bruta de *Aspergillus sp* n°1068 foi purificada em DEAE-Celulose obtendo-se duas frações com características bioquímicas semelhantes. O pH e temperatura ótimas foram 5,6 e 37°C. Apresentaram estabilidade na faixa de pH 5,0-7,0 e foram estáveis a temperaturas inferiores a 50°C por 60 minutos em substrato *p*- nitrofenil- laurato.

8- Os valores de Km e Vmax encontrados em PNPL para fração I foram : 0,092 mmol e 56,98 umol de *p*-nitrofenol/min/mg de proteína e para a fração II : 0,16 mmol e 52,11 umol de *p*-nitrofenol/min/mg de proteína.

9- A lipase de *Aspergillus sp* n°1068 esterifica o ácido oleico, produzindo nas primeiras horas de reação monoleína, dioleína e ao longo da reação trioleína.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 AKTHAR, M.W.; MIRZA, A.Q.; CHUGTAL, M.I.D. Lipase Induction in *Mucor hiemalis*. Applied and Environmental Microbiology, v. 40, n. 2, p. 257-263, 1980.
- 02 ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A. Lipolytic activity of Microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0°C Journal of Food Science, v. 26, p. 512-523, 1961.
- 03 ALFORD, J.A.; PIERCE, D.A.; SUGGS, F.G. Activity of Microbial lipases on natural fats and synthetic triglycerides. Journal of Lipid Research, v. 5, p. 390-394, 1964.
- 04 ARBIGE, M.V.; FREUND, P.R.; SILVER, S.C.; ZELKO, J.T.; Movel lipase for Cheddar cheese flavor development. Food Technology, v. 4, p. 91-98, 1986.
- 05 BENZONANA, G. Some properties of an exocellular lipase from *Rhizopus arrhizus*. Lipids, v. 9, n. 3, p. 166-173, 1974.
- 06 CHANDER H. BATISH, V.K.; SANNABHADTI, S.S., SRINIVASAN, R. A. Factors affecting lipase production in *Aspergillus wentii*. Journal of Food Science, v. 45, p. 598-600, 1980.
- 7 DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T.H. Compendium of soil fungi. Vol.I. Academic press, 1980.
- 08 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, T. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v. 28, p. 350, 1956.

- 09 EITENMILLER, R.R.; VAKIE, J.R.; SWAHANI, K.M. Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. Journal of Food Science, v. 35, p. 130-133, 1970.
- 10 ESPINOSA, E.; SANCHEZ, S.; FARRES, A. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB-H313. Biotechnology Letters, v. 12, n. 3, p. 209-214, 1990.
- 11 FUKUMOTO J.; IWAI M.; TSUJISAKA Y. Studies on lipase I. Purification and crystallization of a lipase secreted by *Aspergillus niger*. J. Gen. Applied microbiol, v. 9, n. 3, 1963.
- 12 GARCIA, H.S.; AMUNDSON, C.H.; HILL, C.G. Partial characterization of the action of an *Aspergillus niger* lipase on butteroil emulsions. Journal of Food Science. v. 56, n. 5, p. 1233-1237, 1991.
- 13 HARPER, W.J.; GOULD, I.A. Lipase systems used in the manufacture of italian cheese. I. General characteristics. Journal of Dairy Science, v. 38, n. 1, 1955.
- 14 HARPER, W.J. Lipase systems used in the manufacture of italian cheese. II. Selective hydrolysis. Journal of Dairy Science, v. 40, n. 5, p. 556-563, 1957.
- 15 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.
- 16 HOFELMANN, M.; HARTMANN, J.; ZINK, A.; SCHREIER, P. Isolation purification and characterization of lipase isoenzymes from a technical *Aspergillus niger* enzyme. Journal of Food Science. v. 50, p. 1721-1725, 1985.

- 17 HOOVER, R.; LAURENTIUS, S.F.; GUNETILEKE, K.G. Spoilage of coconut oil Purification and Properties of a Fungal lipase that attacks coconut oil. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 50, n. 3, p. 64-67, 1973.
- 18 ISHIHARA, H.; OKUYAMA, H.; IKEZAWA, H.; TEJIMA, S. Studies on lipase from *Mucor javanicus*. I. Purification and properties. Biochimica et Biophysica Acta, v. 388, p. 413-422, 1975.
- 19 ISOBE, K.; AKIBA, T.; AMAGUCHI, S. Crystallization and characterization of lipase from *Penicillium cyclopium*. Agricultural Biological Chemistry, v. 52, n. 1, p. 41-47, 1988.
- 20 IWAI, M.; OKUMURA, S.; TSUJISAKA, Y. The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* Westring. Agricultural Biological Chemistry, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1975.
- 21 IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. Agricultural Biological Chemistry, v. 38, n. 6, p. 1241-1254, 1974.
- 22 IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Interconversion of two lipase from *Rhizopus delemar*. Agricultural Biological Chemistry, v. 38, n. 6, p. 1249-1254, 1974.
- 23 IWAI, M.; TSUJISAKA, V.; FUKUMOTO.; Studies on lipase V. Effect of iron ions on the *Aspergillus niger* lipase. J. Gen. Appl. Microbiol, v. 16, p. 81-90, 1969.
- 24 JENSEN, R.G. Symposium: Microbial lipolytic enzymes. Lipids, v. 9, n. 3, p. 149-157, 1974.

- 25 JENSEN, R.G. Detection and determination of lipase. Acylglycerol Hydrolase activity from various sources. Lipids, v. 18, n. 9, p. 650-657, 1983.
- 26 JENSEN, R.G.; DEJONG, F.A.; CLARK, R.M. Determination of lipase specificity. Lipids, v. 18, n. 3, p. 239-252, 1983.
- 27 KINSELLA, J.E.; HWANG, D. Biosynthesis of flavors by *Penicillium roqueforti*. Biotechnology and Bioengineering, v. 18, p. 927-938, 1976.
- 28 KORITALA, S. Esterification of fatty acids by *Aspergillus flavus*. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 65, n. 7, p. 1188-1189, 1988.
- 29 LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATI, J. Short-chain flavour esters synthesis by microbial lipases. Biotechnology Letters, v. 12, n. 8, p. 581-586, 1990.
- 30 LAWRENCE, R.C. Microbial lipases and related esterases. Part I. Detection, distribution and production of microbial lipases. Dairy Science Abstracts, v. 29, n. 1, p. 1-8, 1967.
- 31 LAWRENCE, R.C. Microbial lipases and related esterases. Part II. Estimation of lipase activity, characterization of lipases. Recent work concerning their effect on dairy products. Dairy Science Abstracts, v. 29, n. 2, p. 59-70, 1967.
- 32 LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. Journal of American Chemistry, v. 56, p. 658-666, 1934.
- 33 LINFIELD, W. M.; BARAUSKAS, R.A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 61, n. 2, p. 191-195, 1984.
- 34 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, A.L.F.; RANDALL, R.F. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v. 193, p. 265-275, 1951.

- 35 MATTSON, F.H.; VOLPENHEIN, R.A. Enzymatic hydrolysis at an oil/water interface. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 43, p. 286-289, 1966.
- 36 MORRIS, H.A.; JEZESKY, J.J.. The action of microorganisms on fats. II. Some characteristics of the lipase system of *Penicillium roqueforti*. Journal of Dairy Science. v. 36, p. 1285-1297, 1953.
- 37 NAGAOKA, K.; YAMADA, Y.; KOAZE, Y. Studies on *Mucor* lipase. Part I. Production of lipases with a newly isolated *Mucor sp.* Agricultural Biological Chemistry, v. 33, n. 3, p. 299-305, 1969.
- 38 NAGAOKA, K.; YAMADA, Y. Purification of *Mucor* lipases and their properties. Agricultural Biological Chemistry, v. 37, n. 12, p. 2791-2796, 1973.
- 39 NAHAS, E. Control of lipases production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. Journal of General Microbiology, v. 134, p. 227-233, 1988.
- 40 NAIR, C.S.; BONE, D.H. Production of lipase of *Aspergillus foetidus* in a batch stirred reactor. Biotechnology Letters, v. 9, n. 8, p. 601-604, 1987.
- 41 OHNISHI, K.; YOSHIDAY.; SEKIGUCHI, J. Lipase Production of *Aspergillus Oryzae*. Journal of fermentation and Bioengineering, v.77, n.5, p.490-495, 1994.
- 42 OKEKE, C.N.; OKOLO, B.N. The effect of cultural conditions of the production of lipase by *Acremonium strictum*. Biotechnology Letters, v. 12, n. 10, p. 747-750, 1990.

- 43 OKUMURA, J.; KINSELLA, J.E. Methyl ketone formation by *Penicillium camemberti* in model systems. Journal of Dairy Science, v. 68, n. 1, p. 11-15, 1985.
- 44 OKUMURA, S.; IWAI, M.; TOMINAGA, Y. Synthesis of ester oligomer by *Aspergillus niger* lipase. Agricultural Biological Chemistry, v. 48, n. 11, p. 2805-2808, 1984.
- 45 OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. Agricultural Biological Chemistry, v. 40, n. 4, p. 655-660, 1976.
- 46 OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. Purification and properties of partial glyceride hydrolase of *Penicillium cycloptium M1*. Journal Biochemistry, v. 87, n. 1, p. 205-211, 1980.
- 47 OKUMURA, S.; IWAI, M.; TSUJISAKA, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agricultural Biological Chemistry, v. 45, n. 1, p.185-189, 1981.
- 48 PAL, N.; DAS, S.; KUNDU, A.K. Influence of culture and nutritional conditions on the production of lipase by submerged culture of *Aspergillus niger*. Journal Fermentation Technology, v. 56, n. 6, p. 593-598, 1978.
- 49 PARK, Y.K.; PASTORE, G.M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 9, n. 2, p. 167-171.
- 50 PASTORE, G.M; PARK, Y.K. Produção e caracterização bioquímica de monoacilglicerol lipase microbiana e aplicação de lipases na hidrólise e esterificação enzimática. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP.

- 51 POKORNY, D.; FRIEDRICH, J.; CINERMAN, A. Effect of nutritional factors on lipase Biosynthesis by *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters, v. 16, n. 4, p. 363-366, 1994.
- 52 POSORSKE, L.H.; Industrial-scale application of enzymes to fats and oil industry. Journal of American Oil Chemist's Society, v. 61, n. 11, p. 1758-1760, 1984.
- 53 RIVERA MUÑOZ, G.; VALENCIA, T.; SANCHEZ, S.; FARRÉS, A. Production of microbial lipases in a solid state fermentation system. Biotechnology Letters, v. 13, n. 4, p. 277-280, 1991.
- 54 SHIPE, W.F. A study of the relative specificity of lipases produced by *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus niger*. Archives Biochemistry, v. 30, p. 165-179, 1951.
- 55 SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J. Lipase activity of *Mucor pusillus*. Applied Microbiology, v.16, n.4, p.617-619, 1968.
- 56 SOMKUTI, G.A.; BABEL, F.J.; SOMKUTI, A.C. Lipase of *Mucor pusillus*. Applied Microbiology, v. 17, n. 4, p. 606-610, 1969.
- 57 SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. Agricultural of Food Chemistry, v. 52, n. 6, p. 1591-1592, 1988.
- 58 SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. Biotechnology Letters, v. 11, n. 12, p. 895-898, 1989.
- 59 TAHOUN, M.K.; EL KADEY, F.; WAHBA, A.A. Hydrolysis of synthetic and natural triglycerides by an intracellular lipase from *Aspergillus niger*. Fat Science Technology, v. 9, p. 261-263, 1987.

- 60 TOROSSIAN, K.; BELL, A.W. Purification and characterization of an Acid - Resistent triacylglycerol lipase from *Aspergillus niger*. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 13, p. 205-211, 1991.
- 61 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.
- 62 TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Glyceride synthesis four kinds of microbial lipase. Biochimica et Biophysica, v. 489, p. 415-422, 1977.
- 63 YAMAMOTO & FUJIWARA N. Purification and some Properties of a Castor-oil Hydrolyzing Lipase from *Pseudomonas sp.* Agricultural Biological Chemical, v.52, n.12, p.3015-3021, 1988.