

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA

TESE DE DOUTORADO

**“PRODUÇÃO DE LIPASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS:
ESTUDOS CINÉTICOS E SÍNTESE DE ÉSTERES”**

Candidata: Maria do Carmo de Barros Pimentel

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Campinas, São Paulo

1996



UNIDADE	IG
N.º CHAMADA:	2
	T 11.0
	F64
V.	
I	27550
P.	667/96
	X
P.	R\$ 11,00
D.	26/04/96
N.º 170	



CM-00087263-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

Pimentel, Maria do Carmo de Barros
P649p Produção de lipases por fungos filamentosos : estudos cinéticos e síntese de ésteres / Maria do Carmo de Barros Pimentel -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química.

1. Lipases. 2. Penicillium. 3. Hidrólises. I. Durán Caballero, Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

In memoriam dos meus pais e
de minhas tias Aurelina e Dorinha.

**Ao meu esposo William e aos meus
filhos Victor, Vanessa e Veruska.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo e filhos pelo apoio e compreensão durante a realização do curso.

Ao Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballera pela orientação científica, compreensão e apoio nas dificuldades para realização do curso.

Ao colega e **Co-orientador** Prof. Dr. Eduardo Henrique Magalhães Melo pelo contato com o Prof. Dr. Nelson Durán e pelo apoio na parte experimental.

Ao colega Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pela paciência, compreensão e apoio científico.

Ao Prof. Dr. William Ledingham pelas sugestões e correções dos trabalhos publicados.

À Profa. Francisca Simas Teixeira, pela sua amizade e colaboração, doando duas das cepas testadas.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho, Diretor do Lab. de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pelo apoio científico, pela amizade, pelo incentivo e por permitir o uso das instalações do laboratório.

Ao meu irmão Fernando Carneiro pelo apoio, amizade e ajuda gráfica e em computação.

A todos os professores e estudantes que direta ou indiretamente contribuíram para elaboração desta tese.

A todos os técnicos que colaboraram na manutenção da infraestrutura do laboratório.

Aos amigos e familiares pelo apoio à minha família durante minha permanência em Campinas.

Aos colegas e amigos que me acolheram em Campinas, durante a realização do curso.

À Profa. Dra. Valdinete Lins pelo incentivo, apoio e acolhimento em Campinas.

Às instituições de suporte financeiro CAPES, UFPE, FINEP, FACEPE, JIKA, CNPq.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xx
1 . INTRODUÇÃO	1
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	3
2.2. FONTES DE LIPASES	6
2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS LIPASES	8
2.3.1. Enriquecimento de Óleos e Gorduras Naturais	8
2.3.2. Produção de Ésteres Comerciais	10
2.3.3. Produção de Compostos Opticamente Ativos	13
2.3.4. Produção de Amidas	18
2.3.5. Tratamento de Efluentes	19
2.3.6. Indústria de Papel	19
2.3.7. Indústria de Detergentes	20
2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIOLÓGICAS	20

2.5. PROPRIEDADES DAS LIPASES	24
2.6. CARACTERÍSTICAS DO <i>Penicillium citrinum</i>	27
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. MATERIAIS	31
4.1.1. Microrganismos	31
4.1.2. Reagentes	31
4.1.3. Meios de Cultura	31
a) Meio de Manutenção das Culturas (BDA)	31
b) Meio de D-glucose (MG)	31
c) Meio de óleo de oliva (ME)	31
d) Meio Rico (MR)	31
e) Meio de Sulfato de Amônio (MA)	32
f) Meio do Subproduto da Refinaria de Óleos vegetais	32
4.2. MÉTODOS	32
4.2.1. Condições de Cultivo	32
4.2.2. Determinação da Biomassa	33
4.2.3. Estudos dos parâmetros ótimos para a produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i>	33
a) Determinação da Concentração da Fonte de Carbono	33
b) Estudos da Fonte de Nitrogênio	33
c) Estudos da Presença de íons Fe ⁺⁺	34

d) Determinação do pH ótimo para produção de Lipase	34
e) Efeito da Concentração de Sulfato de Amônio	34
f) Efeito da Concentração de KH_2PO_4 na Produção de Lipase	34
g) Estudo do Tipo de Fonte de Carbono para Produção de Lipase	34
4.2.4. Investigação da Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> usando Fermentação em Bateladas Alimentadas (“Fed-Batch”)	35
4.2.5. Preparação do Extrato Enzimático Bruto	35
a) Utilizando o Meio ME	35
b) Utilizando o Meio MA	35
4.2.6. Determinação das Atividades Enzimáticas	36
a) Lipase - Método Titulométrico	36
b) Lipase - Método Espectrofotométrico do p-Nitrofenil palmitato	36
c) Lipase - Método Colorimétrico do Cobre	37
d) Protease	37
4.2.7. Determinação da Concentração de Proteínas	38
4.2.8. Determinação da Concentração de Citrinina	38
4.2.9. Propriedades dos Extratos Enzimáticos Brutos	39
a) Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Lipase	39
b) Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Lipase	39
4.2.10. Efeito da Concentração de Substrato	40
4.2.11. Especificidade da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i>	40

4.2.12. Reações de Síntese Catalisadas pela Lipase de <i>Penicillium citrinum</i>	41
a) Síntese de Triglicerídios	41
b) Síntese de Éster Lipídico de D-Glucose	42
4.2.13. Cromatografia em Camada Fina (TLC) dos Produtos de Reação	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO PRODUTOR DE LIPASE	43
5.2. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO <i>Penicillium citrinum</i> ..	43
5.3. PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO <i>Penicillium citrinum</i> NO MEIO ME	56
5.4. PRODUÇÃO DE LIPASE PELO <i>Penicillium citrinum</i> NO MEIO MA	59
5.5. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SOBRE A PRODUÇÃO DA MICOTOXINA CITRININA ..	74
5.6. PRODUÇÃO DE LIPASE PELO <i>Penicillium citrinum</i> USANDO FERMENTAÇÃO EM BATELADAS ALIMENTADAS (“FED-BATCH”)	77
5.7. RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA LIPASE DE <i>Penicillium citrinum</i>	86
a) Produzida em Meio ME	86
b) Produzida em Meio MA	86
5.8. PROPRIEDADES DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS DA LIPASE DE <i>Penicillium citrinum</i>	88

5.8.1. Estabilidade ao Armazenamento	88
5.8.2. Efeito do pH na Atividade e Estabilidade da Lipase ..	90
5.8.3. Efeito da Temperatura na Atividade e Estabilidade da Lipase	97
5.8.4. Especificidade da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> ...	107
5.8.5. Efeito da Concentração de Substrato	107
5.8.6. Reações de Síntese Catalisadas pela Lipase de <i>Penicillium citrinum</i>	110
6. CONCLUSÕES	115
7. PERSPECTIVAS	118
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
9. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE	129

ABREVIATURAS

- 1,3-Dipalmitoil-2-monooleína - **POP**
- 1(3)- Palmitoil-3 (1)-estearil-monooleína - **POSt**
- 1,3-Diesteroil-2- monooleína - **StOSt**
- Polietileno glicol - **PEG**
- Lipase de *Pseudomonas sp.* - **LP**
- D-glucose pentacetato - **GP**
- Foods and Drugs Administration - **FDA**
- Lipase de *Candida cylindracea* - **LCC**
- Lipase de *Candida antartica* - **LCA**
- Meio de Batata-dextrose-agar - **BDA**
- Meio de D-glucose - **MG**
- Meio de óleo de oliva - **ME**
- Meio rico - **MR**
- Meio com sulfato de amônio - **MA**
- Meio com subproduto da refinaria de óleo - **MS**
- p-Nitrofenilpalmitato - **pNPP**
- p-Nitrofenol - **pNP**
- Ácido etilenodiaminotetraacético - **EDTA**
- Fluoreto de fenilmetilsulonila - **PMSF**
- Cromatografia em camada fina - **TLC**
- p-Nitrofenilmiristato - **pNPM**
- p-Nitrofenillaurato - **pNPL**
- Penicillium citrinum* - **PC**
- Polivinil pirrolidona - **PVP**
- Dodecil sulfato de sódio - **SDS**

Ácido tricloro acético - **TCA**

Gliocladium viride - **GV**

Fusarium lateritium - **FL**

Constante de decaimento - **K_D**

Tempo de meia-vida - **T_{1/2}**

Constante de Michaelis-Menten - **K_M**

Velocidade máxima - **V_M**

p-Nitrofenilcaprilato - **p-NPC**

Ácido oléico - **AO**

Trioleína - **TO**

Lipase de *Candida cylindracea* solúvel - **CCS**

Lipase de *Candida cylindracea* imobilizada - **CCI**

Lipase de *Penicillium citrinum* solúvel - **PCS**

Lipase de *Penicillium citrinum* imobilizada - **PCI**

Padrão de citrinina - **P**

Meio **MA** com óleo de soja (pH 6,5) - **MAS**

Meio **MA** com óleo de milho (pH 6,5) - **MAM**

Meio **MA** com óleo de soja (pH 4,5) - **MAs**

Meio **MA** com óleo de milho (pH 4,5) - **MAm**

Meio **ME** com glicerol - **MGO**

Meio **MA** (pH 6,5 em tampão fosfato de potássio 50 mM) - **MA1**

Meio **MA** (pH 6,5 em tampão fosfato de potássio 100 mM) - **MA2**

RESUMO

Penicillium citrinum, isolado como contaminante do óleo de oliva, foi o melhor produtor de lipase, quando comparado com o *Gliocladium viride* 136B e *Fusarium lateritium* 48, em meio contendo extrato de levedura (Meio **ME**, 2880 U/L) ou sulfato de amônio com sais minerais (Meio **MA**, 1585 U/L), utilizando óleo de oliva (1% v/v) como fonte de carbono, no pH inicial de 4,5. A maior atividade lipolítica específica (7,8 U/mg proteínas), livre de protease e da micotoxina citrinina foi obtida no meio **MA**. Não ocorreu alteração na produção quando foi utilizado 1-30 mM de KH_2PO_4 no pH inicial 4,5, entretanto, em concentrações acima de 50 mM ocorreu inibição na produção da lipase de *Penicillium citrinum*. A produção desta enzima em Meio **ME** foi maior (3200 U/L) usando fermentação em bateladas alimentadas (“fed-batch”) com simples ou múltiplos pulsos de ácido oléico, ou linoléico, ou linolênico, ou Tween 80, numa concentração final de 0,04 ou 0,1% (v/v). O extrato enzimático bruto concentrado e liofilizado foi estável ao armazenamento à temperatura ambiente por 8 meses, enquanto que o filtrado bruto do meio de cultura armazenado a 6°C apresentou um tempo de meia-vida de 30-35 dias, e foi instável ao congelamento e descongelamento, perdendo 50% da atividade inicial. Ambas as lipases obtidas nos Meio **ME** e **MA** foram estáveis à temperaturas abaixo de 40°C durante 2 horas e totalmente inativadas à 60°C após 30 min de pré-incubação. A enzima produzida no Meio **MA** mostrou uma cinética de desativação térmica complexa e uma energia de ativação da desativação térmica de $22,4 \pm 2,2 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, calculada de acordo com a equação de Arrhenius usando as primeiras constantes de decaimento.

A lipase de *Penicillium citrinum* hidrolisou preferencialmente os triglicerídios contendo ácidos graxos de cadeia longa. Entretanto, em relação aos ésteres lipídicos do p-nitrofenol foi observada uma cinética de Michaelis-Menten com um K_M aparente para o p-nitrofenilpalmitato (**pNPP**) de $0,502 \pm 0,105$ mM (Meio **ME**) e $0,332 \pm 0,059$ mM (Meio **MA**); $0,787 \pm 0,001$ mM para o p-nitrofenilmiristato (**pNPM**) e $1,74 \pm 0,004$ mM para o p-nitrofenillaurato (**pNPL**), usando a enzima produzida em meio **MA**. A lipase produzida em Meio **MA** foi capaz de catalisar a síntese do éster lipídico do glicerol, usando ácido oléico como doador do grupo acil, após 15h de incubação a 37°C , mas não catalisou a síntese do éster de ácido láurico de D-glucose complexada com ácido fenilborônico, após 24h de incubação a 45°C em álcool tert-butílico.

ABSTRACT

Brazilian strain of *Penicillium citrinum*, isolated as a contamination from olive oil, was the best lipase producer on medium containing yeast extract (Medium **ME**, 2880 U/L) or ammonium sulfate plus mineral salt (Medium **MA**, 1585 U/L), using olive oil (1% v/v) as carbon source, the maximum specific activity was obtained on Medium **MA** (7.8 U/ mg proteins) at initial pH 4.5, free of protease and mycotoxin citrinin. There was no effect using KH_2PO_4 1-30 mM at initial pH 4.5, with concentrations higher than 50 mM there was inhibition of lipase yield. This production was improved on Medium **ME** (3200 U/L) using fed-batch fermentation with simple or multiple pulse of oleic, or linoleic, or linolenic acid, or Tween 80 at 0.04 or 0.1% (v/v), final concentration. *Penicillium citrinum* lipase concentrated and lyophilised was stable during 8 months at room temperature (28-30°C), while the crude culture filtrate has shown a half-life of 30-35 days at 6°C. It was not stable at frozen and defrosted condition, losing 50% of initial activity. Both lipases (Media **ME** and **MA**) were stable at temperatures up to 40°C for 2 hours and completely deactivated at 60°C after pre-incubation during 30 minutes. The enzyme obtained from Medium **MA** has shown a complex kinetic of thermo and pH deactivation. The activation energy of the thermo deactivation was $22.4 + 2.2 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, according to Arrhenius equation using the first decay constants. This lipase hydrolysed triglycerides containing long chain fatty acids preferably. In relationship to lipidic esters of p-nitrophenyl, this lipase has shown a Michaelis-Menten kinetic, with apparent K_M $0.502 \pm 0.105 \text{ mM}$ (Medium **ME**) and 0.332 ± 0.059 (Medium **MA**) for p-nitrophenylpalmitate (**pNPP**),

while for p-nitrophenylmyristate (**pNPM**) and p-nitrophenyllaurate (**pNPL**) were 0.787 ± 0.001 mM and 1.74 ± 0.004 mM respectively, using lipase from Medium **MA**. *Penicillium citrinum* lipase catalysed the synthesis of glycerol ester using oleic acid as acyl donor, after 15 hours at 37°C, but it was not able to catalyse the synthesis of ester using D-glucose complexed with phenylboronic acid and lauric acid, after 24 hours at 45°C on tert-butyl alcohol.

LISTA DE FIGURAS

5.1.1. Produção de Lipase em Meio ME pelos Fungos Filamentosos <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Gliocladium viride</i> e <i>Fusarium lateritium</i>	44
5.2.1. Efeito da Composição do Meio de Cultura na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i>	46
5.2.2. Variação do pH (inicial) Durante a Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Diferentes Meios de Cultura	47
5.2.3. Efeito da Concentração de Óleo de oliva na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> , em Meio ME , Utilizando Pré-inóculos em Meio MG (0,2% de D-glucose)	49
5.2.4. Efeito da Concentração de Óleo de Oliva na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> , Utilizando Pré-inóculos nos respectivos Meios ME	51
5.2.5. Efeito da Concentração de Extrato de Levedura e da fonte de nitrogênio na Produção de Biomassa do <i>Penicillium citrinum</i>	53
5.2.6. Efeito da Concentração de Extrato de Levedura e Sulfato de Amônio na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i>	54
5.2.7. Curva de Crescimento Celular e Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio ME	55
5.3.1. Efeito da Concentração de Óleo de Oliva na Produção de Protease pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio ME	57
5.3.2. Efeito da fonte de nitrogênio na Produção de Protease pelo <i>Penicillium citrinum</i>	58
5.4.1. Efeito da Fonte de Nitrogênio e da Presença de Íons Fe^{++} na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i>	60

5.4.2. Produção de Atividade Lipolítica Específica em Diferentes Fontes de Nitrogênio	61
5.4.3. Efeito da Concentração de Sulfato de Amônio na Produção de Lipase em Meio MA	63
5.4.4. Variação de pH Durante a Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio ME e MA	64
5.4.5. Morfologia do <i>Penicillium citrinum</i> Durante a Produção de Lipase em Meio MA em Diferentes valores de pH	66
5.4.6. Efeito do Tipo de Óleos Comerciais sobre a Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA	68
5.4.7. Curva de Crescimento e Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA	69
5.4.8. Curva de Crescimento e Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA , contendo o Subproduto da Refinaria de Óleos Vegetais, como Fonte de Carbono	70
5.4.9. Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA , contendo Óleo de Oliva ou Subproduto da Refinaria de Óleos Vegetais, como Fonte de Carbono	71
5.4.10. Turbidez do Filtrado Bruto do Meio de Cultura (MA) Durante a Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em presença de Oliva ou Subproduto da Refinaria de Óleos Vegetais como Fonte de Carbono	72
5.4.11. Efeito da Concentração de KH_2PO_4 na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> Meio MA	75
5.4.12. Turbidez do Filtrado Bruto do Meio de Cultura (MA), Durante a Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> , Contendo Diferentes Concentrações de KH_2PO_4	76

5.5.1. Produção de Citrinina pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Diferentes Meios de Cultura e pH	79
5.5.2. Produção de Citrinina pelo <i>Penicillium citrinum</i> com Diferentes Óleos Vegetais como Fonte de Carbono	80
5.6.1. Produção de Lipase e Biomassa, Variação de pH e Consumo Óleo de Oliva pelo <i>Penicillium citrinum</i> , em Meio ME , Contendo 0,25% de Extrato de Levedura e 1% de Óleo de Oliva	82
5.6.2. Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Fermentação em Bateladas Alimentadas, Meio ME , Usando Pulsos Simples de Indutor de 0,04% (Concentração Final)	84
5.6.3. Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Fermentação em Bateladas Alimentadas, Meio ME , Usando Pulsos Simples de Indutor de 0,1% (Concentração Final)	85
5.8.1.1. Estabilidade ao Armazenamento do Filtrado Enzimático Bruto da Lipase Produzida pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio ME	89
5.8.1.2. Estabilidade ao Armazenamento do Filtrado Enzimático Bruto da Lipase Produzida pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA	91
5.8.1.3. Estabilidade do Filtrado Enzimático Bruto da Lipase Produzida em Meio MA , pelo <i>Penicillium citrinum</i> , ao Congelamento e Descongelação	92
5.8.2.1. Curva de pH da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , Produzida em Meio ME	93
5.8.2.2. Curva de pH da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , Produzida em Meio MA	94

5.8.2.3. Estabilidade ao pH da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , Produzida em Meio ME	95
5.8.2.4. Cinética do Efeito de pH Sobre a Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA)	96
5.8.2.5. Constantes de Decaimento da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA), em Diferentes valores de pH	98
5.8.2.6. Tempo de Meia-Vida da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA), em Diferentes valores de pH	99
5.8.3.1. Cinética da Estabilidade Térmica da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA)	101
5.8.3.2. Constantes de Decaimento da Lipase Produzida pelo <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA), em Diferentes Temperaturas	102
5.8.3.3. Tempo de Meia-Vida da Lipase Produzida pelo <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA), em Diferentes Temperaturas	103
5.8.3.4. Energia de Ativação da Desativação Térmica da Lipase <i>Penicillium citrinum</i> (Meio MA), de Acordo com a Teoria de Arrhenius	106
5.8.5.1. Influência da Concentração de Substrato (pNPP) sobre a Atividade da Lipases de <i>Penicillium citrinum</i>	109
5.8.5.2. Efeito da Concentração de Diferentes Ésteres Lipídicos do p-Nitrofenol sobre a Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , Obtida em Meio MA	111
5.8.6.1. Cromatografia dos Produtos das Reação da Síntese de Ésteres de Glicerol Catalisada pela Lipase de <i>Penicillium citrinum</i>	114

LISTA DE TABELAS

2.2. Principais Fontes Comerciais de Lipases de Acordo com VORDERWÜLBECKE e col., 1992	7
2.5. Propriedades de Algumas Lipases de Fungos de Acordo com SAKAGUCHI e col., 1992	26
5.2. Efeito da Concentração de Óleo de Oliva e Condições de Cultivo do Pré - Inóculo na Produção de Lipase pelo <i>Penicillium citrinum</i>	50
5.5. Produção de Citrinina ($\mu\text{g/mL}$ de Meio de Cultura) pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Diferentes Meios de Cultura e pH	78
5.7. Recuperação e Concentração da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> Produzida em Meio ME	87
5.8.2. Constante de Decaimento e Tempo de Meia-Vida da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , em Diferentes Valores de pH e Temperatura	104
5.8.4. Especificidade da Lipase Produzida pelo <i>Penicillium citrinum</i> em Meio MA, em Relação à Hidrólise de Diferentes Triglicerídios	108
5.8.5. Efeito da Concentração de Diferentes Ésteres Lipídicos do p-Nitrofenol sobre a Atividade da Lipase de <i>Penicillium citrinum</i> , Produzida em Meio ME e MA	112

1 . INTRODUÇÃO

A aplicação biotecnológica de microrganismos, enzimas livres ou imobilizadas, apresenta vantagens significativas sobre as reações químicas tradicionais. Uma das principais vantagens destes processos é a enantio e estereoseletividade, na qual misturas de compostos opticamente ativos são economicamente produzidos em reações catalizadas por enzimas.

Embora atualmente, a biotransformação não possa competir com a produção química, já otimizada, de compostos industrialmente importantes, como por exemplo, essências, adoçantes artificiais, fármacos, etc., poderia gradativamente, substituí-las devido à grande demanda de compostos naturais biodegradáveis, que não causam danos ao meio ambiente. Por exemplo, a produção química de compostos, tais como: esteróides, terpenóides, alcalóides, antibióticos, carboidratos e ésteres estruturados, álcoois e compostos sintéticos com estruturas alifáticas, alicíclicas, aromáticas ou heterocíclicas, geralmente requerem condições drásticas de temperatura e pressão, produzindo impurezas como produtos de degradação, que inviabilizam seu uso em alimentos sem redistilação prévia, tornando o processo energética e economicamente dispendioso. Conservação de energia e redução da degradação térmica tornam a biotransformação um processo mais atrativo que os processos químicos tradicionais.

Reações hidrolíticas enzimáticas reversas para produção de ésteres têm estimulado a otimização de processos em meios com baixo teor de água, para produção de compostos largamente utilizados em indústrias de alimentos, produção de emulsificantes, essências e fármacos. A prova que a indústria está seriamente interessada na alternativa enzimática é ilustrado pelo rápido crescimento de patentes e publicações.

Dentre os processos biológicos utilizados nas biotransformações, as lipases se destacam por sua versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese. Embora as lipases sejam produzidas por células animais, vegetais e por diferentes gêneros de microrganismos, os fungos têm sido a principal fonte industrial de lipases, principalmente para síntese de compostos de alto valor agregado.

Lipases de fungos filamentosos, cuja a maioria são 1,3-específicas, têm sido utilizadas comercialmente nos seguintes processos: síntese de triglicerídios estruturados, de emulsificantes, tratamento de efluentes, indústrias de papel, farmacêuticas e de detergentes.

Em todas as três principais reações, hidrólise, alcoólise e glicerólise, temos simplicidade, qualidade superior do produto final e excelente produção. Estas características conferem às lipases potencial biotecnológico comparável com o das proteases e carboidrases, enzimas industrialmente utilizadas, estimulando pesquisas para otimização da produção, caracterização e aplicação industrial.

Todas as aplicações biotecnológicas das lipases justificam a elaboração deste trabalho, tendo em vista a viabilidade econômica do processo baseada principalmente em parâmetros gerais como: a) seleção de novos microrganismos; b) otimização da produção de lipases, inibindo seletivamente produtos indesejáveis; c) tempo de produção da enzima, abreviado pelo uso de microrganismos com altas atividades; d) estudos de algumas propriedades da enzima, importantes para sua aplicação industrial.

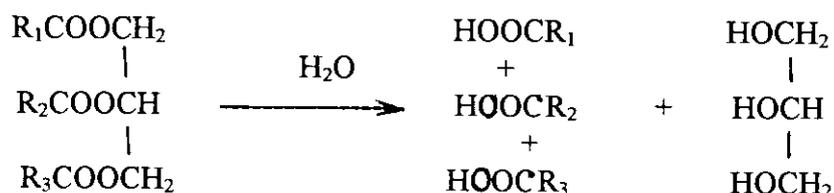
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

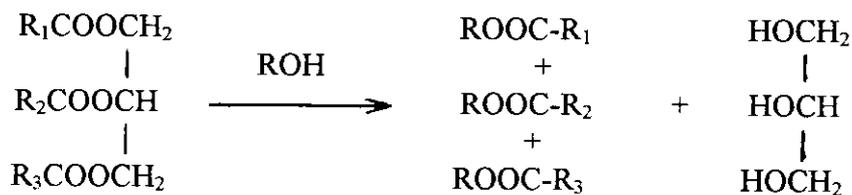
As lipases (glicerol ester hidrolases EC 3.1.1.3) apresentam enorme potencial de aplicação na indústria óleoquímica. Gorduras e óleos são produzidos mundialmente em cerca de 6×10^7 t/ano e uma parte significativa desta produção, cerca de 2×10^6 t/ano, é utilizada em reações de hidrólise, alcoólises e glicerólises (VULFSON,1993).

As lipases são capazes de catalisar as seguintes reações:

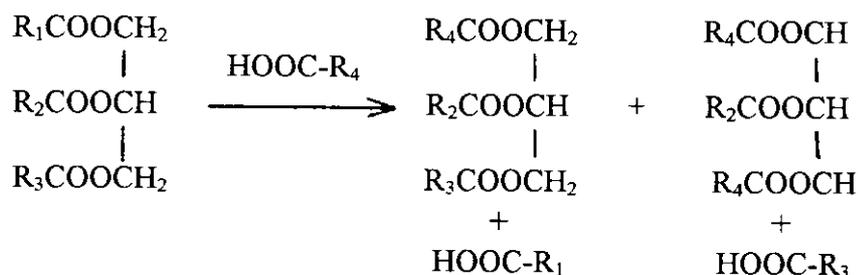
a) Hidrólise:



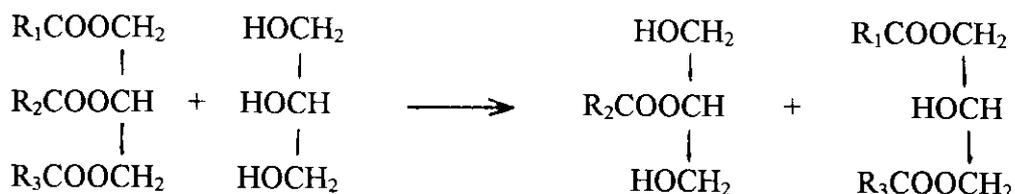
b) Alcoólise:



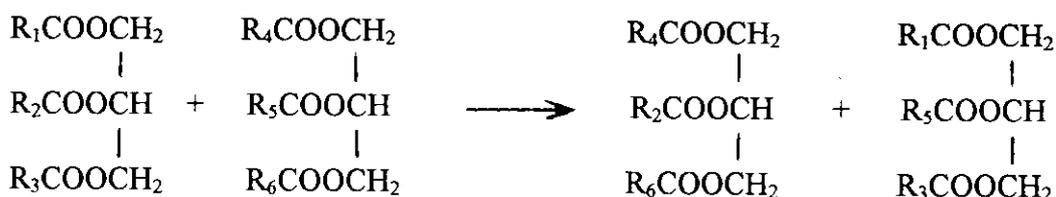
c) Acidólise:



d) Glicerólise:



e) Transesterificação:

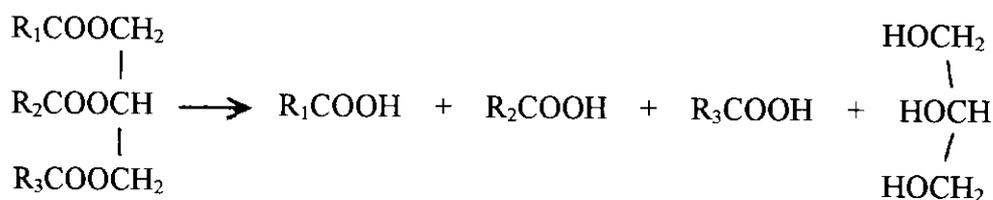


Segundo MACRAE (1983) e FOGLIA e col. (1993), as lipases, de acordo com a especificidade, estão divididas em três grupos:

1) Lipases não-específicas:

Catalisam a hidrólise completa do triglicerídios em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diglicerídios como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas fluorescens* têm sido comumente usadas para síntese de acilglicerol, alcoólise e interesterificação de glicerídios (Eq. I).

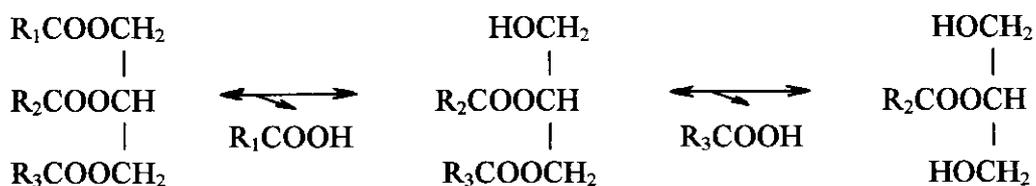
Equação I:



2) Lipases 1,3-específicas:

Catalisam a hidrólise dos ácidos graxos ligados ao C₁ e C₃ do glicerol, produzindo ácidos graxos e 2-monoglicerídios ou 1,2- ou 2,3-diglicerídios, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acil produzindo 1,3-diglicerídios e 1- ou 3-monoglicerídios. Neste grupo, temos como exemplo, as lipases produzidas pelo *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei* e por várias espécies de *Rhizopus* (Eq. II).

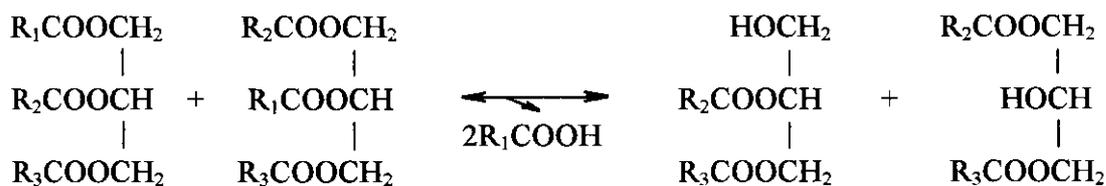
Equação II:



3) Lipases ácido graxo específicas:

São específicas para hidrólise de ésteres com determinados ácidos graxos, como por exemplo, a lipase produzida pelo *Geotrichum candidum* hidrolisa preferencialmente ésteres de ácidos graxos de cadeia longa insaturados, com dupla ligação em cis, no C₉. Ésteres com ácidos graxos saturados ou sem insaturação no C₉, são lentamente hidrolisados. Devido à esta especificidade, lipase de *Geotrichum candidum* tem sido estudada para alcoólise de óleos selecionados que contem ácidos graxos poliinsaturados (Eq.III).

Equação III:



Devido a sua versatilidade, as lipases têm sido aplicadas em diferentes sistemas para processos biotecnológicos de compostos de interesse industrial e em química fina. As reações de síntese catalisadas por lipases requerem uma quantidade reduzida de água em vez de sistemas anidros, pois a água é essencial para a catálise enzimática, devido à contribuição para as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio preservando a estrutura protéica. A quantidade de água influencia na solubilidade do substrato e dos produtos, causando efeito sobre a posição de equilíbrio e rendimento químico.

Estudos detalhados do centro ativo das lipases podem levar a um conhecimento mais amplo da sua estereoespecificidade, facilitando sua utilização em solventes orgânicos para produção de compostos enantioméricos. Análise da estrutura da lipase de *Mucor miehei*, utilizando cristalografia e difusão de raio X com uma resolução de 3Å, tem mostrado a presença de uma tríade formada por Ser-His-Asp no centro ativo, sendo o resíduo de serina cataliticamente ativo. Nesta lipase, uma superfície de α -hélice recobre a tríade catalítica, adotando uma conformação totalmente diferente, de natureza hidrofóbica, na mistura de reação enzimática, que permite a ligação do substrato lipídico ao sítio ativo da enzima (BJÖRKLING e col.,1991 e TILBEURGH e col.,1993).

2.2. FONTES DE LIPASES

As lipases são produzidas por células animais, vegetais e microbiológicas (VORDERWÜLBECKE e col.,1992). As lipases de microrganismos, bactérias, leveduras e fungo filamentosos, são as mais importantes comercialmente, devido a facilidade de produção (**TABELA 2.2**).

TABELA 2.2 - Principais fontes comerciais de lipases de acordo com VORDERWÜLBECKE e col., 1992.

LIPASES	FONTES COMERCIAIS
<i>Aspergillus niger</i>	Amano
<i>Rhizopus delemar</i>	Amano
Porcine pancreas	Fluka
Porcine pancreas	Serva
Porcine pancreas	Sigma
<i>Candida cylindracea</i>	Amano
<i>Candida cylindracea</i>	Sigma
<i>Candida lipolytica</i>	Amano
<i>Geotrichum candidum</i>	Amano
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Amano
<i>Mucor javanicus</i>	Amano
<i>Rhizopus</i>	Nagase
<i>Rhizopus javanicus</i>	Amano
<i>Rhizopus niveus</i>	Amano
Porcine pancreas	Merck 24548
<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades
Wheat germ	Sigma
Biolipase conc.	Biocon
<i>Aspergillus oryzae</i>	Roehm
<i>Bacillus subtilis</i>	Roehm
Pancreas	Roehm
<i>Aspergillus niger</i>	Roehm
<i>Aspergillus niger</i>	Roehm
Lipase FAP	Biocon
Pregastric esterase	Biocon
Lipoprotein lipase	Biocon
Cholesterol esterase	Biocon
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Gist-Brocades
<i>Mucor miehei</i>	Gist-Brocades
Lipase Lot. 12012036	Seppim
Lipase Lot. 12021066	Seppim
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Genzyme Biochemicals
Lipoprotein lipase	Genzyme Biochemicals
<i>Candida cylindracea</i>	Genzyme Biochemicals
<i>Pseudomonas sp.</i>	Genzyme Biochemicals
Biolipase A	Biocon
<i>Penicillium sp.</i>	Amano
<i>Penicillium roquefortii</i>	Amano
<i>Humicola lanuginosa</i>	Amano
Pancreatin	Hoechst
Pig liver esterase	Amano
Lipomod AC	Biocatalysts
Lipomod RD	Biocatalysts
<i>Candida cylindracea</i>	Sigma
<i>Rhizopus sp.</i>	Serva
<i>Candida lipolytica</i>	Biocatalysts
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Biocatalysts
<i>Geotrichum candidum</i>	Biocatalysts
<i>Humicola lanuginosa</i>	Biocatalysts
<i>Mucor miehei</i>	Biocatalysts
Animal lipase	Biocatalysts
<i>Penicillium cyclopium</i>	Biocatalysts
<i>Penicillium roquefortii</i>	Biocatalysts
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Biocatalysts
<i>Rhizopus delemar</i>	Biocatalysts
<i>Rhizopus japonicus</i>	Biocatalysts
<i>Rhizopus javanicus</i>	Biocatalysts
<i>Candida lipolytica</i>	Fluka
<i>Mucor javanicus</i>	Fluka
<i>Penicillium roquefortii</i>	Fluka
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Fluka
<i>Rhizopus niveus</i>	Fluka

Lipases de fungos filamentosos, cuja maioria são 1,3 - específicas, têm sido utilizadas comercialmente, porque funcionam perfeitamente em solventes orgânicos parcialmente anidros, sem requerer cofatores, algumas aceitam fosfolípidios como substrato, como por exemplo, a lipase de *Mucor miehei*, em um processo contínuo num bioreator de coluna por mais de 1000 horas, com boa recuperação do produto (VULFSON,1993).

O reconhecimento das vantagens da utilização de lipases em relação aos processos químicos tradicionais, indica que as lipases podem adquirir potencial no comércio de enzimas. Logo, o desenvolvimento tecnológico das lipases para síntese de novos compostos, resultará na sua expansão em novas áreas e num maior impacto na área industrial (BJÖRKLING e col.,1991).

2.3 . APLICAÇÃO INDUSTRIAL DAS LIPASES

2.3.1) Enriquecimento de óleos e gorduras naturais:

A Companhia Biotecnológica Calgene de Davis, Califórnia, produziu Canola (“rapeseed”), planta cujas sementes são utilizadas para produção de óleo comercial, geneticamente manipulada para produzir altos níveis de ácido láurico (ácido graxo abundante em óleo de côco e palma, mas raro em plantas de clima temperado). Óleos com alto teor de ácido láurico são usados principalmente em sabões, detergentes e cosméticos. Em 1993, os Estados Unidos importaram 600.000 toneladas destes óleos (KLEINER, 1995).

Os óleos de mostarda e de Canola são comercialmente importantes devido ao alto teor de ácido erúcico (45-55%), ácido graxo de cadeia longa. Os ácidos graxos de cadeia longa (C₂₀-C₂₄) são lubrificantes de alto grau,

solventes para pesticidas e outros aerossóis. Existem dois óleos de Canola, um com baixo e outro com alto teor de ácido erúcico. A lipase não-específica de *Candida cylindracea*, em sistemas com baixa quantidade de água, catalisou preferencialmente a hidrólise de triglicerídios contendo ácido graxo com número de carbono não superior a 18. Aumentando a quantidade de água, aumenta a hidrólise de ácidos graxos de cadeia longa, acima de 18 carbonos (C₂₀-C₂₄), aumentando a concentração de ácido erúcico liberado. Logo, em quantidades reduzidas de água, o principal produto da hidrólise destes óleos é o diacilglicerol, sendo 80% de dierucina, constituindo um método prático para concentrar estes óleos (KAIMAL e col., 1993).

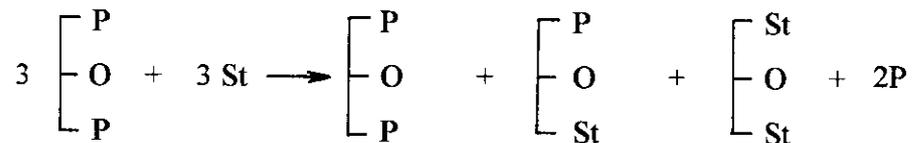
A interesterificação é um processo usado nas indústrias de óleos e gorduras, para modificar as propriedades das misturas de triglicerídios.

Sódio metálico ou alcóxido de sódio são usados quimicamente, como catalisadores para promover a migração do grupo acil dentro da molécula de triglicerídio, produzindo uma mistura de glicerídios na qual os resíduos estão aleatoriamente distribuídos. As gorduras e óleos naturais, ou quimicamente produzidos, apresentam diferentes composições de triglicerídios de baixo valor nutritivo, o qual pode ser melhorado através de reações de transesterificação ou alcoólise, em sistemas com baixo teor de água.

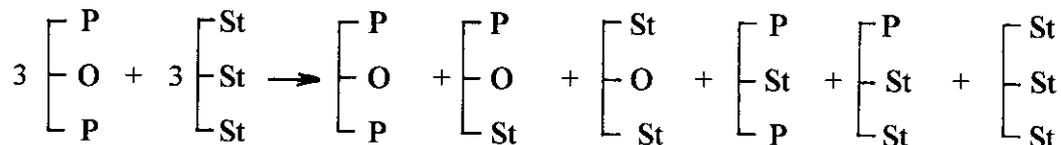
Um dos principais exemplos é a interesterificação de 1,3-dipalmitoil-2-monooleína (POP), o qual é o principal triglicerídio do óleo de palma, com o ácido esteárico ou triestearina, produzindo 1(3)-palmitoil-3(1)-estearil-monooleína (POSt) e 1,3-diesteroil-2-monooleína (StOSt), principais componentes da manteiga de cacau, obtendo as características sensoriais utilizadas na produção de chocolates (MACRAE, 1983, BJÖRKLING e

col.,1991 e VULFSON, 1993) (Eq. IV e V).

Equação IV:



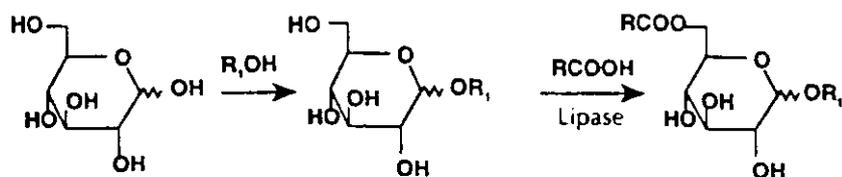
Equação V:



2.3.2) Produção de ésteres comerciais:

Síntese de ésteres de ácidos graxos é largamente utilizada na indústria de alimentos, cosméticos, fármacos, etc. A síntese química do emulsificante oleato de polioxietileno, mostrou efeitos tóxico devido à produção de uma mistura de isômeros não biodegradáveis, formados devido às altas temperaturas utilizadas no processo. A síntese enzimática de emulsificantes, em condições suaves de reação, tem levado a um produto biodegradável com propriedades semelhantes ao produto natural. Lipase de *Candida antarctica* imobilizada, produziu o 6-O-acilglicopiranosideo com 90% de rendimento, pela indústria NOVO-NORDISK em escala piloto (VULFSON, 1993) (Eq. VI).

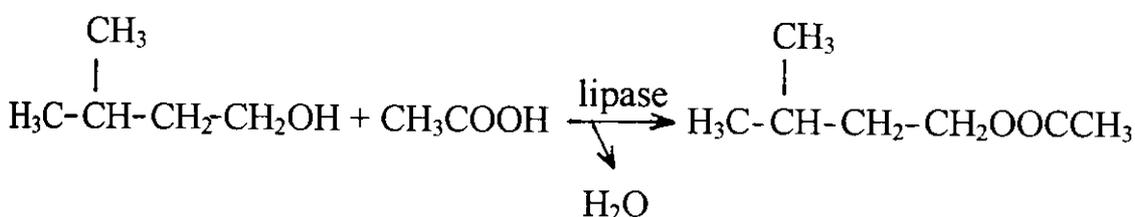
Equação VI:



Segundo RAZAFINDRALAMBO e col. (1994), ésteres de baixo peso molecular representam uma importante classe de aromatizantes, constituídos por derivados de ácidos de cadeia curta como acetatos, propionatos e butiratos. A síntese enzimática destes compostos, em solventes orgânicos, é mais específica e mais viável que a produção química a partir de vegetais, porque independe de estação, clima e variação geográfica e não requer grandes quantidades de matéria-prima.

A otimização de síntese de ésteres de acetatos é uma etapa essencial para produção destes ésteres, porque poucas lipases são capazes de catalisar esta esterificação, devido à inibição pelo ácido acético, o qual pode ser reduzido com o aumento da quantidade de enzima e redução da quantidade deste ácido. Como por exemplo, a síntese do éster acetato de isoamílico em n-heptano, um dos mais usados em alimentos (74.000 Kg/ano) por ter sabor característico da banana (Eq. VII).

Equação VII:

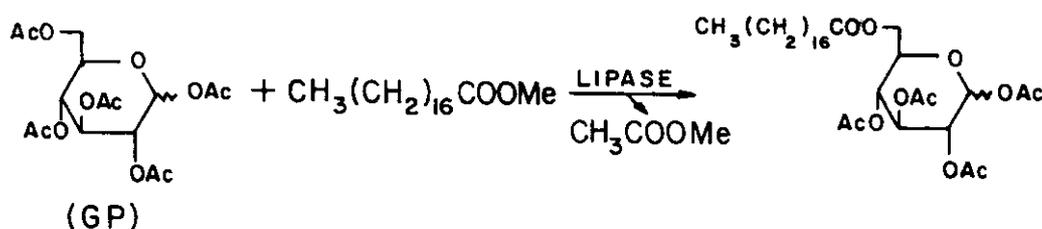


Monoglicerídios acetilados em adição a outros emulsificantes tais como, lecitina, mono e diglicerídios, ésteres de sorbitan e monoglicerídios succinilados, são largamente usados em indústrias de alimentos e farmacêuticas (AKOH, 1994). Estes monoglicerídios são produzidos quimicamente pela esterificação de triglicerídios, triacetina e glicerol, seguida por destilação molecular, um processo de alta energia, para isolar a

mistura de monoglicerídios mono e diacetilados, os quais são usados como agentes estabilizantes, plastificantes, anti-espumantes e emulsificantes. Por exemplo, a síntese de ésteres de ácidos graxos de D-glucose acetilada, utilizando óleos vegetais e seu metil éster como acil doadores, estudada por AKOH (1994). Essa esterificação ocorre em solventes orgânicos, utilizando o Trisun 80 (contendo 80% de ácido oléico), oleato de metila e lipases de *Candida antarctica* ou *Candida rugosa* imobilizadas. Este sistema de reação apresentou um rendimento de 6,4 e 52% respectivamente, enquanto que a esterificação da D-glucose com ácido oléico mostrou um rendimento entre 31 a 100%.

De acordo com AKOH, (1994), estas enzimas também foram capazes de produzir ésteres de ácidos graxos de D-glucose utilizando D-glucose livre e Trisun 80 como substratos, com rendimento 100%. As melhores condições foram obtidas usando-se lipase 10% do peso do substrato, 48 horas de incubação a 55°C, com uma relação molar de Trisun e D-glucose pentacetato (GP) de 1:2, 3mL de solvente e 3% de água (Eq. VIII).

Equação VIII:



Os ésteres de ácidos graxos de anidrosorbitóis constituem a maior classe de surfactantes éster carboxílicos, utilizados em indústrias de alimentos, detergentes e cosméticos (MUKESH e col., 1993).

Anidrosorbitóis são produzidos comercialmente por esterificação direta de sorbitol com ácidos graxos a 225-250°C, na presença de ácido

como catalisador. Durante esta reação ocorre desidratação em vários graus, produzindo uma mistura de mono e di-ésteres de sorbitol, sorbitano e isosorbídeos. As lipases têm sido usadas para catalisar a esterificação de isosorbitol e sorbitol com ácido oléico a 50°C. Após 13 horas foi obtido 95% de monooleato de isosorbídeos, maior rendimento que o obtido com sorbitol. Nesta reação, foram produzidos o mono e dioleatos de sorbitol, sendo que a esterificação ocorreu primeiro na hidroxila primária e depois mais lentamente nas hidroxilas secundárias (MUKESH e col., 1993).

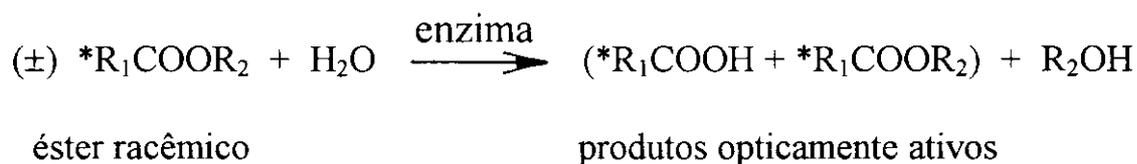
Lipase de *Mucor miehei* catalisou a esterificação do polietileno glicol (PEG) 400 com ácido oléico (acil doador) em hexano, produzindo após 50 horas a 42°C, 85% de mono e dioleato de PEG. Ésteres de PEG são utilizados como anti-espumantes, surfactantes não-iônicos, emulsificantes em pesticida, diluentes medicinais e lubrificantes (JANSSEN e HAAS, 1994).

2.3.3. Produção de compostos opticamente ativos:

As lipases, principalmente, têm mostrado grande potencial na síntese de compostos enantiomericamente puros, tais como, ésteres, ácidos e álcoois. Estes compostos podem ser preparados em sistemas aquosos, segundo a reação de hidrólise, ou em sistemas orgânicos, segundo a reação de síntese. Como por exemplo:

1) A hidrólise de um éster racêmico em sistema aquoso (Eqs. IX e X)

Equação IX: Ácido quiral

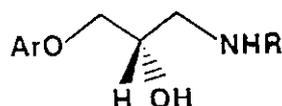


Recentemente, FABER e FRANSSEN (1993) têm obtido sucesso com novas técnicas de melhoramento da seletividade das reações catalisadas pelas esterases e lipases. Estas técnicas baseiam-se no estudo da seletividade destas enzimas de acordo com: a) tipo de composto acil doador; b) modificação química de algum resíduo de aminoácido da cadeia protéica ; c) variação do sistema de solventes (engenharia de meio).

A atividade biológica, toxicidade, liberação da droga e metabolismo, podem ser dramaticamente diferente para o enantiômero de uma droga quiral, como por exemplo, a talidomida, cujo S-enantiômero provoca morte e deformação fetal, enquanto que o R-enantiômero possui as propriedades sedativas. No entanto, até recentemente a maioria das drogas quirais eram comercializadas como racematos. Há mais de 500 drogas, vendidas atualmente como misturas racêmicas, com pouca ou nenhuma informação sobre as propriedades dos estereoisômeros individuais (MARGOLIN, 1993). Em 1992, devido à complexidade da quiralidade na atividade biológica, a FDA (US Food and Drug Administration) adotou um programa, a longo prazo, que permite às indústrias farmacêuticas, a escolha de desenvolvimento de drogas quirais como racematos ou como simples enantiômeros. Isto significa que o desenvolvimento de racematos não está proibido, mas tais drogas terão que ser rigorosamente justificadas, para a sua aprovação pela FDA. Conseqüentemente, a maioria das indústrias tem decidido desenvolver simples enantiômeros em vez de racematos e a minoria decidiu evitar problemas, produzindo moléculas não-quirais. Com isto, o programa da FDA criou muitas oportunidades para os químicos na área de quirotecnologia, desde que, a venda anual das principais drogas opticamente ativas tem sido estimada em cerca de 10 bilhões de dolares.

Recentes avanços na síntese de compostos opticamente puros, têm levado as indústrias farmacêuticas a investirem em pesquisas sobre os métodos viáveis para obtenção destes compostos. Dentre estes métodos, o biocatalítico tem despertado grande interesse. Enzimas hidrolíticas, tais como, proteases, hidrolases e lipases têm sido utilizadas em mais de 50% das biotransformações publicadas. A aplicação destas enzimas, principalmente de lipases, tem sido particularmente fácil devido ao grande número de fontes comerciais, às suas estabilidades em solventes orgânicos e o ao não requerimento de cofatores (FABER e FRANSSEN, 1993).

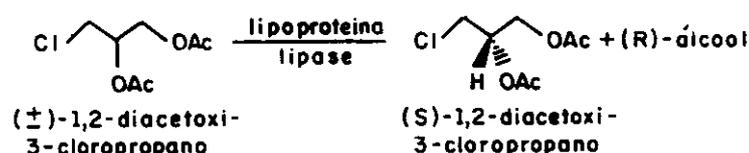
De acordo com KLOOSTERMAN e col.(1988), as lipases, por serem estereoseletivas, apresentam grande potencial de aplicação na síntese quimo-enzimática de intermediários quirais para produção de agentes β -adrenérgicos opticamente ativos, chamados β -bloqueadores. Estes compostos são utilizados no tratamento de hipertensão e angina, e apresentam estrutura característica do ariloxipropanolamina contendo um centro quiral.



Na indústria farmacêutica apenas 20% dos β -bloqueadores produzidos são aprovados para uso clínico. Em geral, a atividade do β -bloqueador reside no (S)-enantiômero, como por exemplo, o (S)-propranolol é 100 vezes mais ativo que o (R)-enantiômero. Entretanto, com exceção do (S)-timolol, (S)-penbutolol e (S)-levobunolol, todos os β -bloqueadores aprovados pela FDA (Foods and Drugs Administration) são vendidos como racematos. Até a década de 1980, apenas poucos métodos, todos não enzimáticos, têm sido descritos para preparação β -bloqueadores

enzimáticos, têm sido descritos para preparação β -bloqueadores opticamente ativos. Atualmente o uso de enzimas para produção de intermediários quirais (“building blocks”) de β -bloqueadores, tem despertado grande interesse pelas indústrias farmacêuticas. Podemos citar como exemplo, a hidrólise enantioselectiva do (\pm)-1,2-diacetoxi-3-cloropropano, catalisada por lipase para produzir o (S)-enantiômero com 90% ee (excesso enantiomérico) (Eq. XIII).

Equação XIII:



Em condições alcalinas, o (S)-enantiômero pode ser condensado com vários fenóis em (S)-3-ariloxi-1,2-propanodióis, a partir do qual vários β -bloqueadores podem se quimicamente sintetizados, como por exemplo, o (S)-propanolol.

As lipases também são utilizada para síntese estereoseletiva de agentes antiinflamatórios não-esteróides, largamente usados no tratamento de doenças do tecido conjuntivo. Como por exemplo, a síntese do naproxeno, o qual o (S)-enantiômero é 28 vezes mais ativo *in vivo* que o (R)-enantiômero, catalisada por lipases dos gêneros *Rhizopus*, *Mucor* e *Candida* têm exibido alta estereoseletividade por diferentes ésteres do naproxeno. Dentre estas, apenas a lipase de *Candida cylindracea* apresentou preferência (S)-estereoquímica (MARGOLIN, 1993).

Derivados de hidantoina tem várias atividades biológicas, estes são utilizados principalmnte em medicina e na agricultura. Tais derivados possuem um centro estereogênico na posição-5, razão pela qual estes são

utilizados como racematos. A lipase catalisa a hidrólise destes racematos produzindo hidantoinas opticamente ativas (MIZUGUCHI e col., 1994).

De acordo com EBIKE e ACHIWA (1994), lipases têm sido usadas na preparação de compostos enantiomericamente puros, como por exemplo, a produção do homoquiral (R)-(+)-nilvadipina (droga anti-hipertensiva), o qual é sintetizado a partir de um substrato proquiral produzido por hidrólise assimétrica catalisada pela lipase de *Pseudomonas sp.* (LP) (Eq. XIV).

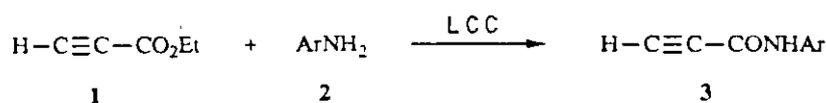
Equação XIV:



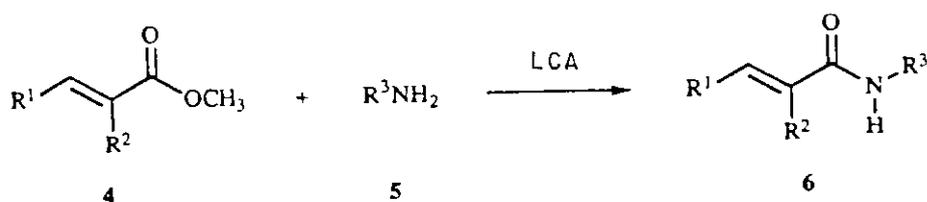
2.3.4. Produção de amidas:

As lipases, ao contrário das amidases, são ativas em solventes orgânicos, têm especificidade relativa ao substrato e não catalisa a hidrólise da ligação amida. A lipase de *Candida cylindracea* (LCC) catalisou a aminólise entre diferentes ésteres acrílicos e aminas alifáticas. Enquanto que a lipase de *Candida antarctica* (LCA) catalisou a produção de amidas acrílicas opticamente ativas com alto excesso enantiomérico a partir de aminas racêmicas (PUERTAS e col., 1993) (Eqs. XV; XVI e XVII)

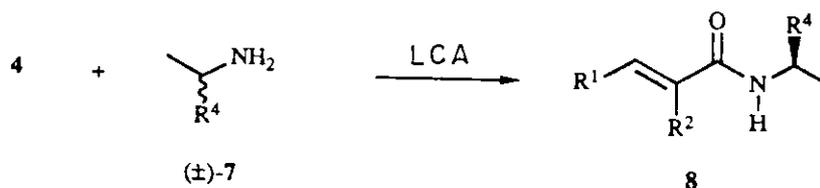
Equação XV: Amidas



Equação XVI: Amidas acrílicas



Equação XVII: Amidas acrílicas quirais



Alguns derivados de amida do ácido propiônico têm mostrado atividade bactericida, enquanto que amidas α,β -insaturadas têm sido utilizadas na síntese de materiais poliméricos. Algumas lipases mostraram propriedades enantioseletivas na amidação de ésteres racêmicos, tais como, etil (\pm)-2-cloropropionato e 2-metilbutirato, utilizados na síntese de polímeros (PUERTAS e col., 1993).

2.3.5. Tratamento de efluentes:

Os fungos filamentosos são capazes de assimilar por difusão direta, lipídios de cadeia longas, os quais são encontrados nos efluentes industriais. *Norcardia*, *Rhodococcus* ou *Hicrothrix parvicella*, foram usados no tratamento de efluentes, reduzindo a produção de espumas devido à biomassa, facilitando o tratamento (RATLEDGE,1992).

2.3.6. Indústria de papel

A pasta de celulose produzido pela indústria papeleira apresenta formação de compostos com alto teor de gordura que formam o “pitch” na máquina de papel causando uma queda significativa e dispendiosa na produção. Os métodos convencionais de adição de talco à polpa, reduzem mas não solucionam o problema. Pesquisa sobre a composição destes compostos, mostraram que os triglicerídios são polimerizados e

clorados devido às insaturações de seus ácidos graxos constituintes. A hidrólise enzimática destes triglicerídios por ação de lipases, liberam os ácidos graxos, os quais são saponificados com hidróxido de sódio na lavagem. Este método tem apresentado bons resultados produzindo um “pitch” menos adesivo, após o tratamento (BJÖRKLING e col.,1991 e FISCHER e MESSNER,1992).

2.3.7. **Indústrias de detergentes:**

Adição de lipases a detergentes para remoção de manchas gordurosas, imunes às proteases, tem levado à redução de temperatura e tempo de lavagem necessários para um processo eficiente e conseqüente economia de energia (NOTHENBERG,1991).

Atualmente o principal mercado para enzimas industriais ainda é a sua aplicação em detergentes uma vez que para produção das mesmas utiliza-se em média cem vezes menos energia que nas lavanderias (FALCH,1991).

2.4. PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIOLÓGICAS

Em relação à produção de enzimas microbiológicas de interesse industrial, 25-50% dos custos de produção deve-se à matéria prima, podendo ser reduzido pelo uso de resíduos industriais e substratos abundantes na natureza, como meio de cultura, visando a recuperação do produto. Carboidratos e proteínas insolúveis devem ser evitados para não dificultar a recuperação da enzima, encarecendo os custos do processo (ARBIGE e PITCHEN,1989).

Vários gêneros de fungos filamentosos têm sido estudados como fontes de lipases, por exemplo, *Aspergillus*, *Mucor*, *Geotrichum*,

Curvularia, *Drechslera*, *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Pycnoporus*, *Sclerotium*, *Stachylidium*, *Staurophoma*, *Syncephalis*, *Thanatephorus*, *Thielavia*, *Trichocladium* e *Verticillium* (RAPP e BACKHAUS, 1992).

Dentre estas cepas, a produção de lipases pelo *Penicillium citrinum* tem sido estudada por SZTAJER e MALISZEWSKA (1989). Usando uma cepa isolada do solo, cultivada em meio de cultura definido, contendo 2% (p/v) de amido, 5% (p/v) de peptona, 0,1% (p/v) de extrato de levedura, sais minerais e 1% (p/v) de óleo de oliva como indutor a pH 7,2, obtiveram uma produção máxima de lipase extracelular de 1120 U/L após 48 horas, a 22°C com agitação (150 rpm). Experimentos posteriores, usando as mesmas condições de cultura, mostraram que Tween 80 (0.7% p/v) e óleo de oliva (0,1% p/v) estimulavam de 5,5 e 6 vezes respectivamente, enquanto o ácido láurico inibiu a produção de lipases pelo *Penicillium citrinum* ao contrário dos ácidos linoléico, linolênico e oléico, que aumentaram a produção de lipases. (MALISZEWSKA e MASTALERZ, 1992).

OHNISHI e col. (1994) determinaram as condições ótimas para produção de lipase pelo *Aspergillus oryzae* (0,46 U/L após 96 h), utilizando 2% (p/v) de D-glucose como fonte de carbono e 1% (p/v) de extrato de levedura e 2% (p/v) de polipeptona como fontes de nitrogênio, no pH inicial de 5-6 e 28°C com agitação (120 rpm). A produção de lipase aumentou para 0,78 U/L, quando 3% (p/v) de óleo de soja foi adicionado como indutor. Os resultados obtidos sugeriram que a lipase de *Aspergillus oryzae* é constitutiva e que ocorreu a produção de 2 tipos de lipase com diferentes especificidades.

POKORNY e col. (1994) estudaram a produção de lipases pelo *Aspergillus niger* em ausência de lipídios, embora a produção tenha sido

melhor na presença de indutor. A concentração e fonte do indutor não foram significativos para obter este resultado. Amido em baixas concentrações estimulou a produção de lipase, mas o melhor rendimento foi obtido pela adição de NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio e KH_2PO_4 como fonte de fósforo, complementados com íons Mg^{++} no pH inicial de 5,0.

A especificidade e estabilidade das lipases microbianas podem ser moduladas pelas condições de cultivo, devido à produção de múltiplas formas. Por exemplo, 3 lipases comerciais de *Candida rugosa* apresentaram diferentes composições protéicas, eficiências catalíticas e especificidades, quando comparadas aos resultados encontrados na literatura. Tween 80 e Tween 20 aumentaram o rendimento (2,9 e 5,7 vezes maior, respectivamente) e a produção de múltiplas formas (lipase C e lipase B, respectivamente). De acordo com a eletroforese, a lipase produzida com estes surfactantes apresentaram, uma banda maior com Tween 80 e duas bandas maiores com Tween 20, diferentes do padrão produzido sem surfactante. A lipase produzida na presença de Tween 20 (lipase B) mostrou ter preferência pelo p-nitrofenil dodecanoato, enquanto que a lipase produzida na ausência (lipase A) ou na presença de Tween 80 (lipase C) hidrolisaram preferencialmente o p-nitrofenil decanoato (CHANG e col., 1994).

GUILLOU e col. (1995), utilizando uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, geneticamente manipulada para produzir lipases e protease extracelulares, observaram que a temperatura de cultivo pode regular a produção de diferentes enzimas em vários níveis. Eles obtiveram o máximo de produção destas enzimas, cultivando a 17°C.

Segundo HOU (1994), dentre 12 cepas de fungos filamentosos testados, apenas 4 cepas de *Penicillium citrinum* e 2 cepas de *Penicillium funiculosum* apresentaram atividade lipolítica em meio de batata - dextrose - agar (BDA), contendo óleo de soja como substrato. *Penicillium citrinum* NRRL 6336 produziu lipase no pH 5,5, enquanto que as cepas NRRL 2140, 3754 e 5907 produziram no pH 5,5 e 7,5. Nenhuma das cepas produziu lipase a pH 9,0 e a 60°C.

/ O custo de produção dos biocatalisadores representa uma desvantagem em relação aos catalisadores químicos aplicados industrialmente. Para melhorar a produção de lipases microbiológicas, têm sido estudados diferentes métodos, como a adição de indutores ao meio de cultura. Estes indutores podem ser substratos naturais (óleo de oliva, óleo de soja, etc.) ou artificiais (compostos de Tween), os quais podem ser adicionados ao meio de várias maneiras. Por exemplo, CRUZ e col. (1993) investigaram a otimização estatística da produção de lipase extracelular pelo *Rhizopus delemar*, utilizando resíduos industriais como fontes de carbono e nitrogênio, para viabilizar o processo industrial. / Pasta de soja e dextrina foram inicialmente selecionados como melhores fontes de carbono e nitrogênio. Os resultados mostraram a importância da relação fonte de carbono:fonte de nitrogênio. O máximo de produção foi obtido reduzindo a quantidade de óleo de oliva e adicionando Tween 80 como indutores.

VALERO e col. (1988) utilizaram fermentação em bateladas alimentadas (“fed-batch”), na qual a adição de substrato é feita em pulsos, isto é, adições sucessivas de substrato, após a exaustão do substrato adicionado anteriormente. O outro método seria em fermentação contínua, na qual o substrato é adicionado continuamente, numa velocidade de fluxo constante. A adição de ácidos graxos de cadeia longa tem sido muito

estudada, para induzir a produção de lipases microbiológicas.

SHIMADA e col.(1992) encontraram que a produção de lipase pelo *Geotrichum candidum* era induzida por ácidos graxos de cadeia longa. Resultados similares foram obtidos por OBRADORS e col.(1993) com lipase de *Candida rugosa*, no qual os ácidos caprílico, cáprico e oléico foram os melhores indutores.

Entretanto, óleos comerciais, como óleo de oliva e de soja mostraram ser bons indutores para lipase de *Candida rugosa* (VALERO e col.,1988).

Indutores artificiais derivados do Tween, como por exemplo, o Tween 80 tem mostrado efeito indutor para a produção de lipases de *Aeromonum striatum*, em bateladas alimentadas (OKEKE e OKOLO, 1990).

2.5. PROPRIEDADES DAS LIPASES

Segundo MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), a lipase de *Penicillium citrinum* obtida após 6 dias de cultivo e recuperada do meio fermentado pela adição de 60% de sulfato de amônio, apresentou um pH ótimo de 7,2 e temperatura ótima de 30°C. A atividade enzimática foi estável na faixa de pH entre 5 e 7 (após 30 min de pre-incubação a 4°C) e na faixa de temperatura entre 10 e 40°C (após 10 min de pré-incubação). Cloreto de sódio e de potássio a 1M, não tiveram efeito sobre a atividade lipolítica enquanto que ferro, magnésio e cálcio causaram inibição, quando adicionados à mistura de reação no início da incubação.

A lipase intracelular de *Fusarium oxysporium* f.sp.lini., parcialmente purificada, apresentou um pH ótimo de 7,0 a 37°C. Atividade desta enzima foi maior em relação aos ésteres lipídicos do p-nitrofenil com ácidos graxos de cadeia longa e média (C₈-C₁₈) do que com ácidos graxos de cadeia curta

(C₄). Tanto a hidrólise como a concentração final dos ácidos graxos liberados foi maior, quando esta lipase catalisou a hidrólise da triestearina do que da trioleína. A mesma foi capaz de aumentar em 30% a concentração de ácidos graxos poliinsaturados na posição C₃, utilizando óleos de peixe, como substrato (HOSHINO e col., 1992).

Segundo SAKAGUCHI e col., (1992), a maioria das lipases de fungos apresentam pH ótimo na faixa de 7,0 - 9,0 e uma temperatura ótima entre 30 e 45°C (TABELA 2.5). São estáveis na faixa de pH de 2,0 a 9,0, sendo estáveis aos valores de temperatura ótima. A lipase de *Aspergillus niger* foi severamente inibida por traços de íons Fe⁺⁺, inicialmente esta inibição foi reversível e depois tornou-se irreversível. A maioria das lipases de fungos são 1,3-específicas, exceto as de *Candida cylindracea*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium roquefortii* que são não-específicas.

As lipases extracelulares (I e II) produzidas pelo *Trichosporon fermentans* WU-C12, parcialmente purificada por precipitação com acetona e cromatografia em gel, apresentou um pH ótimo de 5,5 e uma temperatura ótima de 35°C, para hidrólise do óleo de oliva. Ambas as lipases foram estáveis após 24h de incubação a 30°C numa faixa de pH de 4,0-8,0. A lipase I foi estável a 40°C durante 30 min em pH 5,5 enquanto que a lipase II foi estável a 50°C nas mesmas condições (CHEN e col., 1994).

De acordo com HAAS e col.(1992), a lipase de *Rhizopus delemar*, purificada por cromatografia em coluna de afinidade para ácido oléico, apresentou um pH ótimo entre 8,0 e 8,5. A atividade foi estável na temperatura ótima de 30°C. Esta enzima requereu cátions divalentes, tais como, Ba⁺⁺, Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ para alcançar o máximo de atividade lipolítica.

TABELA 2.5 - Propriedades de algumas lipases de fungos de acordo com SAKAGUCHI e col., 1992.

LIPASES	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	<i>Humicola lanuginosa</i>	<i>Candida cylindracea</i>	<i>Mucor miehei</i>	<i>Penicillium cyclopium</i>	<i>Phycomyces nitens</i>	<i>Rhizopus chinensis</i>	<i>Torulopsis ernobii</i>
pH ótimo	5,6	6,3	8,0	5,2; 7,2	9,0	7,0	6,0 - 7,0	6,5	6,5
Temperatura ótima (°C)	25	40	60	30	37	35	37 - 40	40 - 60	45
Estabilidade ao pH	2,2 - 6,8	4,2 - 9,8	6,0 - 10	2,0 - 8,5	3,3 - 10,0	6,5 - 9,0	4,0 - 10,0	2,5 - 11,0	3,0 - 9,0
Temperatura ótima(°C) de estabilidade	50	56	60	37	40	30	45	75	65

A ativação foi máxima, em concentrações iguais ou acima de 10 mM de Ca^{++} . A mesma não sofreu inativação por agentes redutores.

As lipases I e II de *Rhizopus niveus*, purificada por cromatografia em gel, mostraram pesos moleculares e propriedades diferentes. A lipase I apresentou um pH ótimo de 6,0-6,5 e uma temperatura ótima de 35°C, enquanto que para a lipase II estes valores foram de 6,0 e 40°C, respectivamente (KOHNO e col., 1994).

Serratia marscescens Sr 41 8000 produziu uma nova lipase extracelular, cujo pH ótimo foi 8,0 e a temperatura ótima de 45°C para a hidrólise do óleo de oliva. Entretanto esta lipase foi inibida por Co^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} e EDTA, e ativada por Ca^{++} , Li^+ e SDS (MATSUMAE e SHIBATANI, 1994).

A lipase A, extracelular, produzida por *Rhizopus microsporus* UzLT-3, quando estocada durante 12 dias a 20°C, foi completamente convertida em lipase B devido a degradação proteolítica. Estas lipases A e B, parcialmente purificadas, apresentaram o máximo de atividade em pH 4,8 e 8,0 respectivamente, e uma faixa de temperatura ótima de 25-45°C. A lipase A não foi específica para resíduo de ácido oléico (DAVRANOV e col.,1995).

2.6. CARACTERÍSTICAS DO *Penicillium citrinum*

HOSOBUCHI e col. (1993), tem estudado a morfologia do *Penicillium citrinum* para produção de um precursor da pravastatina de sódio, substância usada para reduzir o nível de colesterol no sangue. Segundo estes pesquisadores, fungos filamentosos, usando cultura submersa

em bateladas, podem mostrar dois tipos de morfologia: filamentosa ou esférica. Alguns fatores podem alterar a morfologia, como por exemplo: a) Em condições limitadas de oxigênio, a morfologia passa de esferas definidas para forma filamentosa, aumentando a viscosidade da fermentação e diminuindo a transferência de oxigênio; b) o diâmetro das esferas é determinado pela quantidade de nutrientes, número de esporos inoculados e volume de pré-inóculo. Existe uma relação entre quantidade de nutrientes e número de esferas inoculadas; c) a formação de esferas pode ser coagulativas (requer mais de um esporo para formar uma esfera) ou não-coagulativas (a esfera é formada a partir de um único esporo). O máximo de produtividade do precursor, pelo *Penicillium citrinum*, foi obtido com esferas pequenas e aeração. Os resultados obtidos sugeriram que tanto o tamanho das esferas como a concentração das mesmas afetam a produção do precursor.

Entretanto, de acordo com NIELSEN e KRABBEN (1995), fungos filamentosos em culturas submersas podem crescer como micélios dispersos (hifas elementares) ou como esferas (aglomerados de varias hifas elementares). Esta morfologia de fungos filamentosos pode ser classificada em: morfologia microscópica, a qual determina a forma e o tamanho das hifas elementares; e morfologia macroscópica, a qual determina a forma e o tamanho das esferas. Em culturas submersas de fungos os dois tipos de morfologia são fatores determinantes das propriedades reológicas do meio de fermentação. Em algumas espécies de fungos filamentosos, a morfologia microscópica esta relacionada com a produção de metabólicos secundários. Baseados em dados experimentais, os pesquisadores acima citados, estudaram um modelo matemático para a cultura submersa de *Penicillium chrysogenum*, determinando a influência da

morfologia sobre a cinética de crescimento. Este resultado constitui um dado importante para o funcionamento de bioreatores, uma vez que, a liberação de proteínas extracelulares por fungos filamentosos, ocorre geralmente pela extremidade das hifas elementares, sendo necessário estudos morfológicos para determinar as condições ótimas para produção de proteínas, como por exemplo, enzimas.

A morfologia microscópica do *Trichoderma reesei* QM 9414, em cultura submersa, foi fortemente influenciada pelo pH do meio de cultura, ocorrendo variação na velocidade de crescimento das hifas e na frequência de ramificação, as quais alcançaram um máximo no pH 4,5. O tempo de germinação dos esporos também foi dependente do pH do meio (LEJEUNE e col.,1995).

Muitos problemas morfológicos podem ocorrer durante a fermentação de fungos filamentosos em culturas submersas, como por exemplo, altas concentrações de biomassa, causando problemas de viscosidade e transferência de massa, limitando a difusão dos nutrientes nas células. A concentração de biomassa e estado morfológicos dos micélios afetam diretamente as propriedades reológicas do processo fermentativo (KRISTIANSEN e OLSVIK, 1993).

Penicillium citrinum está largamente distribuído em alimentos e ervas medicinais contaminadas, produzindo uma micotoxina chamada citrinina, a qual é nefro-tóxica para o ser humano (VINÃS e col., 1993 e YAMAZAKI e col., 1979).

Penicillium citrinum também pode utilizar resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono, tal como, casca de arroz deteriorada para produzir celulasas, com 70% de aproveitamento do resíduo (KUHAD e SINGH,1993). Ou produzir pectinases, enzima despolimerizante do material

péctico, facilitando a degradação de substratos lignocelulósicos por fungos filamentosos, sob condições aeróbicas. A síntese é controlada pelos níveis de AMP (MIKHAILOVA e col., 1994).

WOO e col. (1995) têm pesquisado a produção de novos inibidores específicos de cisteínas proteasês pelo *Penicillium citrinum*, isolado de esponja da Baía de Suruga em Shizuoka no Japão. Estes inibidores (catestatina A e B) apresentam grande potencialidade de uso no tratamento de osteoporose, devido sua ação inibitória na liberação de cálcio, inibindo a protease responsável pela degradação do colágeno ósseo, causado pela catestatina B.

3 . OBJETIVOS

Pretendeu-se neste trabalho:

- 3.1. Otimizar a produção de lipases por fungos filamentosos;
- 3.2. Investigar as condições de recuperação e purificação da lipase produzida pela cepa selecionada;
- 3.3. Determinar algumas propriedades cinéticas da lipase;
- 3.4. Testar a aplicação da lipase para síntese de ésteres, em sistemas com baixo teor de água.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. **Microorganismos:**

Penicillium citrinum isolado previamente (PIMENTEL e col.,1994), como contaminante do óleo de oliva.

Gliocladium viride 136B e *Fusarium lateritium* 48 isolados da madeira em decomposição pela Profa. Francisca Simas Teixeira na Universidade Federal de Manaus.

4.1.2. **Reagentes:**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico MERCK ou SIGMA. Óleo de oliva comercial de marca “Galo” e óleos comerciais de soja e milho.

4.1.3. **Meios de cultura:**

a) Meio de manutenção dos fungos (**BDA**):

Batata (14% p/v) + 2% (p/v) de dextrose +1,5% (p/v) de agar.

b) Meio líquido com D-glucose (**MG**):

1% (p/v) de D-glucose + 0,5% (p/v) de extrato de levedura, pH 6,0 (inicial);

c) Meio líquido com óleo de oliva (**ME**):

1% (v/v) de óleo de oliva + 0,5% (p/v) de extrato de levedura, pH 6,0-6,5 (inicial);

d) Meio líquido rico (**MR**):

De acordo com SZTAJER e MALISZEWSKA (1989).

2% (p/v) de amido + 0.5% (p/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,025% (p/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0,5% (p/v) CaCO_3 + 0,05% (p/v) KH_2PO_4 + 0,1% (p/v) de extrato de levedura + 5% (p/v) de peptona + 1% (v/v) de óleo de oliva, pH 7,2 (inicial).

e) Meio líquido com sulfato de amônio (**MA**):

De acordo com COX e THOMAS (1991).

1% (v/v) de óleo de oliva + 0,75% (p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 0,015% (p/v) de KH_2PO_4 + 0,015% (p/v) NaCl + 0,11% (p/v) MgSO_4 + 1,5 mg/L ZnSO_4 + 0,1mg/L FeSO_4 , pH 4,5 (inicial);

f) Meio líquido com o subproduto da refinaria de óleos vegetais (**MS**):

Meio **MA**, substituindo o óleo de oliva por 1% (p/v) do sub-produto (pH 10) o qual apresenta a seguinte composição (p/v): 60% de material lipídico; 35% de carboidratos; 2,7 % de sódio; 0,08 % de magnésio; 0,063 % de potássio e 0,004% de zinco. pH inicial 8,0 do meio de cultura.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Condições de cultivo:

Os microrganismos foram conservados em tubos inclinados contendo meio **BDA**, previamente esterilizados. As culturas foram incubadas a 28°C durante 5 dias e conservadas a 4°C, sendo repicadas 5 dias antes de cada experimentos.

As curvas de crescimento foram iniciadas usando-se inóculos a 10% (v/v), meio líquido a ser testado, incubados a 28°C com agitação 100 rpm durante 3 dias, preparados com 10^7 esporos/mL, a partir da cultura semi-sólida. Após este intervalo de tempo, o inóculo era transferido assepticamente para um volume final de 1L de meio de cultura, contido em Erlenmeyers de 2L.

Em intervalos de tempo, alíquotas foram retiradas assepticamente e filtradas em membranas milipore. Os filtrados brutos do meio de cultura foram utilizados para as seguintes determinações: atividade lipolítica; atividade proteásica; concentração de proteínas; turbidez a 650 nm; concentração de triglicerídios.

4.2.2. Determinação da biomassa:

A biomassa foi determinada utilizando-se Erlenmeyers de 250mL contendo 100 mL de meio ME, incubados a 28°C com agitação (100 rpm). Em intervalos de tempo, a fermentação foi interrompida, as células separadas por filtração em papel de filtro, previamente tarados, lavadas exaustivamente com água destilada e em seguida com acetona, pesadas e colocadas a 80°C até peso constante. As amostras foram feitas em triplicatas.

4.2.3. Estudos dos parâmetros ótimos para a produção de lipase pelo

Penicillium citrinum:

a) Determinação da concentração da fonte de carbono:

A concentração de óleo de oliva na produção de lipase foi estudada utilizando o meio ME com 0,2; 0,4; 0,6 e 1% (v/v) de óleo. Foram feitos dois experimentos um utilizando inóculos crescidos em meio MG (com 0,2% p/v de D-glucose) e outro com inóculos crescidos em cada concentração de óleo. Ambos os inóculos foram cultivados nas mesmas condições.

b) Estudos da fonte de nitrogênio:

A concentração de extrato foi investigada utilizando o meio ME contendo 0.2 ou 0,5% (p/v) de extrato de levedura .

A fonte de nitrogênio foi estudada substituindo o extrato de levedura por 0,75% (p/v) de sulfato de amônio (quantidade calculada baseada em 16% da biomassa obtida no meio **ME**), inicialmente, sem sais minerais e, posteriormente, adicionando sais minerais (**MA**) de acordo com COX e THOMAS (1992).

c) Estudos da presença de íons Fe^{++} :

Efeito da presença de íons Fe^{++} foi investigado usando o meio **MA** com e sem FeSO_4 .

d) Determinação do pH ótimo para produção de lipase:

O pH do meio **MA** na produção de lipase pelo *P.citrinum*, foi estudado de dois modos :

- 1) Utilizando-se o meio **MA**,ajustando o pH para 6,5 com solução de NaOH 1M, antes e durante a fermentação;
- 2) Substituindo o KH_2PO_4 do meio **MA** por tampão fosfato de potássio 50 ou 100 mM pH 6,5.

e) Efeito da concentração de sulfato de amônio na produção de lipase:

P.citrinum foi cultivado em meio **MA** com 0,75, 0,5 ou 0,35% (p/v) de sulfato de amônio.

f) Efeito da concentração de KH_2PO_4 na produção de lipases:

Foi determinada utilizando-se o meio **MA** com 1, 10, 30, 50 ou 100 mM de KH_2PO_4 .

g) Estudo do tipo fonte de carbono para produção de lipase:

P. citrinum foi cultivado em meio **MA** contendo 1% (v/v) de óleo de oliva, ou óleo de soja, ou óleo de milho, como fonte de carbono e indutor.

Para todos os parâmetros investigados foram utilizadas as mesmas condições de cultivo descrita anteriormente em 4.2.1.

4.2.4. Investigação da produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* usando fermentação em bateladas alimentadas (“fed-batch”):

Foi utilizado o meio ME contendo 0,25% (p/v) de extrato de levedura contido em Erlenmeyers de 1L de capacidade com um volume de trabalho de 500mL. A fermentação foi iniciada a partir da cultura em meio semi-sólido BDA com 5 dias, usando inóculos de 10% (v/v) (preparados com 10^7 esporos/mL) após 3 dias de crescimento a 28°C, com agitação orbital de 100 rpm. A biomassa foi determinada em 4.2.2.. A concentração de triglicerídios no meio de cultura foi determinada pelo processo de metilação e cromatografia gasosa de acordo com CHRISTIE (1989). A atividade lipolítica foi determinada pelo método pNPP e titulométrico. Usando pulsos simples de diferentes ácidos graxos e Tween 80, no 3° e 5° dia de fermentação.

4.2.5. Preparação do extrato enzimático bruto:

a) Utilizando o meio ME:

P. citrinum foi cultivado em meio ME nas condições acima citada. A fermentação foi interrompida após 4-6 dias de cultivo, as células foram separadas por filtração. Sulfato de amônio sólido até 80% de saturação foi adicionado lentamente ao filtrado e deixado por um pernoite a 4°C, sob agitação suave. O precipitado foi separado por centrifugação (13000 g por 30 min) e ressuspenso em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7,0, para um volume 10 vezes menor que o inicial. Depois dialisado contra o mesmo tampão (6h, duas trocas) e liofilizado.

b) Utilizando o meio MA:

P. citrinum foi cultivado em meio com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Após 5 dias de cultivo, a fermentação foi interrompida, as células foram separadas por filtração e o filtrado foi usado como extrato

enzimático bruto ou concentrado de 5-10 vezes usando-se 80% (p/v) de sulfato de amônio ou membrana milipore CX-30 (seletiva para PM=30.000).

O filtrado foi utilizado para fracionamento com sulfato de amônio, liofilizado e utilizado nas reações de hidrólise ou síntese de ésteres.

4.2.6. Determinação das atividades enzimáticas:

a) Lipase - Método titulométrico:

Usando óleo de oliva purificado como substrato e um titulador (TITRATOR TTT2 RADIOMETER, Copenhague N.V.) para titular os ácidos graxos liberados. A emulsão foi preparada com 3% de goma arábica e 3% de óleo de oliva, agitada no vortex a 150 rpm por 15 min. 25 mL do substrato foram incubados com 5mL do extrato enzimático bruto, a 37°C com agitação. Os ácidos graxos livres liberados pela hidrólise enzimática foram titulados com NaOH 25 mM (STUER e col., 1986). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de ácido graxo livre titulável/min, nas condições padrões (37°C, pH 8,0).

b) Lipase - Método espectrofotométrico do p-nitrofenilpalmitato:

Baseou-se na hidrólise do éster p-nitrofenilpalmitato (pNPP) em p-nitrofenol (pNP) e ácido palmítico (WINKLER e STUCKMANN, 1979). A liberação do p-nitrofenol foi detectada a 410 nm em um espectrofotômetro (CARY 118-VARIAN). Solução A: 90mg de pNPP dissolvidos em 30mL de isopropanol. Solução B: 5g de Triton X-100 + 0,5g de goma arábica dissolvidos em 450mL de Tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0. Substrato: 1mL de solução A colocada gota a gota com agitação em 9mL da solução B.

A mistura de reação foi constituída por 2,7 mL de substrato e 0,3 do

extrato enzimático bruto. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μmol de pNP/min a 37°C e pH 8,0 (Tris-HCl 0,05M). Foi considerado um coeficiente de absorção molar do pNP igual a $1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, para cálculo da atividade.

c) Lipase - Método colorimétrico do cobre:

Baseou-se na determinação de ácidos graxos livres resultantes da hidrólise de triglicerídeos de acordo com KNOW e RHEE (1986). A emulsão foi preparada com uma solução de 1mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP) em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0 e 3% de triglicerídio. 2,7 mL de substrato foram incubados com 0,3 mL do filtrado do meio de cultura, a 37°C e pH 8,0. Em intervalos de tempo definidos, amostras de 0,3 mL foram retiradas da mistura de incubação e recebidas em 2,2 mL de isooctano, sendo levadas a um banho-maria a 100°C durante 2 min. Após este intervalo de tempo, 0,5 mL do reagente cobre-piridina composto por acetato de cobre a 5% pH 6,0 (ajustado com piridina) foi adicionado, agitar durante 90 seg no vortex, deixar em repouso até separação das fases. Ler a fase superior (isooctano contendo o sal de ácido graxo de cobre) a 715 nm. Foi feita uma curva de calibração utilizando-se ácido oleico ou ácido láurico como padrão. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μmol de ácidos graxos/min a 37°C e pH 8,0.

d) Proteases:

Foi determinada pelo método de GINTHER (1979), usando azocaseína como substrato, a 37°C e pH 7,2. A mistura de reação era

composta de 0,25 mL de azocaseína 1% e 0,15 mL do filtrado bruto do meio de cultura. Após 1h de incubação a 37°C, após 15 min à temperatura ambiente, foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloracético (TCA) 10%. A mistura foi centrifugada a 10.000 g por 15 min. 0,8 mL do sobrenadante foram alcalinizados com 1,4 mL de sol. de NaOH 1N e em seguida foi lida a absorbância a 440 nm. Uma unidade de atividade protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para obter uma diferença de absorbância de 1 unidade.min⁻¹. mL⁻¹ de enzima.

Para determinar o tipo de protease produzida em meio ME, amostras do extrato bruto foram incubadas na presença de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) inibidor de metalo proteases e PMSF (floureto de fenilmetilsulonila) inibidor de serina proteases, durante 30 min a 37°C. Após este tempo , foi determinada a atividade proteásica residual.

4.2.7. Determinação da concentração de proteínas:

Foi determinada pelo método de LOWRY e col.(1951), usando-se albumina bovina como padrão.

4.2.8. Determinação da concentração de citrinina:

A produção da micotoxina citrinina foi detectada a partir do extrato clorofórmico do filtrado do meio de cultura, através da absorbância a 360 nm (VINÃS e col., 1993). Para cálculo da concentração de citrinina foi utilizado o coeficiente de extinção $E_{1\text{cm}} = 418$ (obtido com uma solução de 1% de citrinina e 1cm de caminho óptico) de acordo com o Índice MERCK.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi feita de acordo SCOTT e col. (1970), para identificação de micotoxinas sendo visualizada em luz UV.

4.2.9. Propriedades dos extratos enzimáticos brutos:

a) Efeito do pH na atividade e estabilidade da lipase:

Para determinar o pH ótimo da lipase de *P.citrinum* produzida em meio **ME**, a atividade foi determinada pelo método do pNPP (ver 4.2.6 b) na faixa de pH de 5,0-9,0 a 37°C. Foram usados os tampões citrato-fosfato 0,05M (pH 5,0-7,0) e Tris-HCl 0,05M (pH 8,0-9,0).

A determinação do pH ótimo da enzima produzida em meio **MA**, usando-se o método do pNPP foi realizada usando o substrato numa faixa de pH 3,5-9,0 e incubando-se a mistura de reação a 37°C. Foi usado tampão citrato de sódio 0,05M (pH 3,5-6,0) e Tris-HCl 0,05M (pH 7,0-9,0).

A estabilidade da lipase em diferentes valores de pH foi testada utilizando-se amostras de extrato bruto obtido em meio **ME**, foram pré-incubadas a 37°C em diferentes pH 6,0-9,0 nos tampões usados anteriormente por 1 hora. Após este tempo, a atividade lipolítica residual foi determinada pelo método do pNPP nas condições padrões de ensaio.

A cinética do efeito de pH sobre a atividade lipolítica usando-se alíquotas do filtrado enzimático bruto obtido em meio **MA**, foram incubadas em tampões 0,05 M (concentração final) no pH desejado na proporção de 1:1 (v/v) a temperatura ambiente. Foram utilizados tampão acetato de sódio para pH 3,5-6,0 e Tris-HCl para pH 7,0 - 9,0. Em intervalos de tempo, amostras foram retiradas e determinadas as atividades residuais pelo método pNPP nas condições padrões de ensaio.

b) Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da lipase:

Para determinar a temperatura ótima, da lipase produzida em meio **ME**, foi utilizado o método do pNPP incubando-se na faixa de

temperatura de 20-62°C, em tampão fosfato 0,05M pH 8,0.

A temperatura ótima da enzima produzida em meio MA, foi determinada pelo método do pNPP, incubando-se a mistura de reação na faixa de temperatura de 25-60°C, em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0.

Para determinação da estabilidade térmica da lipase foi utilizada a enzima produzida em meio ME, pré-incubada em temperaturas que variaram de 25-60°C, durante uma faixa de tempo de 30-120 min. Após este tempo, as amostras foram submetidas a determinação da atividade residual pelo método do pNPP nas condições padrões de ensaio (37°C e pH 8,0).

Estudos sobre a cinética do efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica foram realizados utilizando-se alíquotas da enzima (filtrado do meio MA) incubadas em banho-maria na temperatura desejada e periodicamente agitada suavemente, no pH do meio 2,4. Em intervalos de tempo, amostras foram retiradas, resfriadas durante 15 min a temperatura ambiente. Após este tempo, a atividade residual foi determinada pelo método pNPP nas condições padrões de ensaio (37°C, pH 8,0).

4.2.10. Efeito da concentração de substrato:

Foi investigada a influência da concentração de substrato sobre a atividade lipolítica pelo método do pNPP (ver 4.2.6 b). Para a lipase produzida em meio ME, a concentração variou de 0-1,0 mM de pNPP e 0-0,8 mM para a enzima produzida em meio MA. As misturas de reação, contendo 2,7 mL de substrato e 0,3 mL de enzima, foram incubadas nas condições ótimas para a atividade lipolítica (37°C e pH 8,0).

4.2.11. Especificidade da lipase de *Penicillium citrinum*:

Foi testada a especificidade da lipase produzida em meio MA, em

relação aos triglicerídios e ésteres lipídicos do p-nitrofenol (**pNP**).

Em relação aos triglicerídios utilizamos emulsões feitas com solução de **PVP** a 1% e 3% de triglicerídios. A mistura de reação continha 1,5 mL de substrato e 1,0 mL de enzima. A atividade foi determinada com descrito anteriormente em 4.2.6 c. Experimento realizado de acordo com STAMATIS e col. (1993). Em relação aos ésteres lipídicos do p-nitrofenol, 2,7 mL de substrato, p-nitrofenilpalmitato (**pNPP**) ou p-nitrofenilmiristato (**pNPM**) ou p-nitrofenillaurato (**pNPL**) nas concentrações que variaram de 0-0,8 mM (ver 4.2.6 b), e 0,3 mL de enzima foram incubados nas condições ótimas para atividade lipolítica.

4.2.12. Reações de síntese catalisada pela lipase de *Penicillium citrinum*:

O processo de síntese requer baixo teor de água na mistura de reação, foram utilizados dois procedimentos para reação de síntese:

a) Síntese de triglicerídios de acordo com PARK e PASTORE, 1989.

4g de glicerol + 1g de ácido oléico + 8 pérolas de vidro foram incubados com 100 mg de lipase liofilizada a 37°C com agitação suave. Em intervalos de tempo, amostras de 0,1mL foram recebidas em 2,4mL de isooctano contidos em tubos com tampa e colocadas a 100°C durante 90 sec. Após esfriar a temperatura ambiente, foram adicionados 0,5 mL do reagente cobre-piridina, agitados 90 sec, deixados em repouso durante 15 min e lida absorbância da fase orgânica a 715 nm. Como descrito anteriormente em 4.2.6 c.

Neste caso uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que cataliza o consumo de 1 μ mol de ácido graxo livre.min⁻¹.

b) Síntese de éster lipídico de D-glucose de acordo com IKEDA e KLIBANOV, 1993.

A acilação regioseletiva de D-glucose é feita em solventes hidrofóbicos, nos quais a D-glucose é insolúvel dificultando a reação. O solvente deve conter cerca de 0,01% de água, para isto foi necessário tratar o solvente com “3Å molecular sieves”. Para solubizar a D-glucose foi feito um complexo usando o ácido fenilborônico, utilizando as seguintes condições:

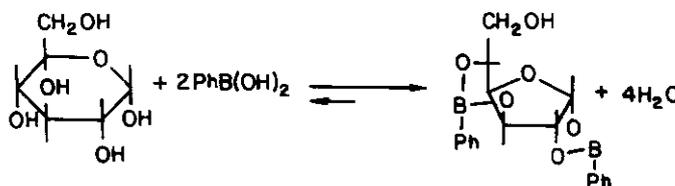
Reação de complexação:

0,75 M de D-glucose + 0,15 M de ácido fenilborônico + 5mL de álcool tert-butilico foram colocados em tubo fechado e incubados durante 8h a 45°C com agitação suave. Após este intervalo de tempo, a formação do complexo foi visivelmente detectada pela total solubilização da D-glucose.

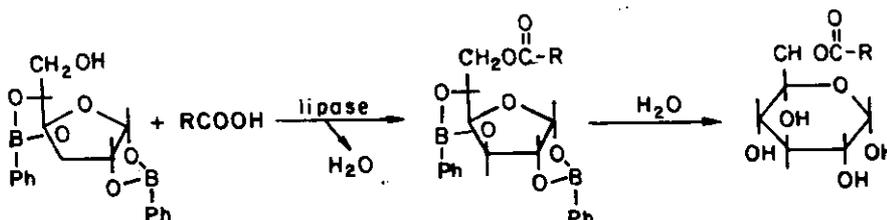
Reação de esterificação:

2 mL da D-glucose complexada + 2 mL de ácido láurico 0,3 M em isooctano + 100mg de lipase liofilizada, foram incubados a 45°C. Em intervalos de tempo, amostras de 0,3 mL da mistura de reação foram recebidas em tubos contendo 2,2 mL de isooctano, para dosagem de ácidos graxos livres como descrito anteriormente em 4.2.6 c.

Reação de complexação:



Reação de esterificação:



4.2.13) Cromatografia em camada fina (TLC) dos produtos de reação:

0,1 mL de amostra das reações de hidrólise ou de síntese + 0,4 mL de éter de petróleo foram utilizados para TLC em placas de sílica gel G (20x20) 0,25 mm impregnada com solução de ácido bórico 5% e ativadas a 120°C durante 20 min. Foram aplicados de 50-100µL de amostra. Foram usados padrões de ácidos oleico e láurico, trioleína e glucose complexada etc. Após aplicação e secagem das amostras, o cromatograma foi desenvolvido no sistema de solventes contendo 85 mL de éter de petróleo + 15 mL de éter etílico + 1 mL de ácido acético. Após desenvolvimento do cromatograma, as placas foram retiradas, o excesso de solvente evaporado a temperatura ambiente e revelados com solução de ácido sulfúrico a 50% a 120°C durante 20 min.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO PRODUTOR DE LIPASE

O melhor produtor de lipase, utilizando o meio **ME**, foi o *Penicillium citrinum* (**PC**) (2850 U/L após 5 dias de cultivo), seguido do *Gliocladium viride* (**GV**) (992 U/L após 7 dias). Enquanto que o *Fusarium lateritium* (**FL**) apresentou baixa atividade lipolítica (82 U/L após 3 dias de cultivo) (**FIGURA 5.1.1**).

5.2. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE LIPASE PELO *Penicillium citrinum*

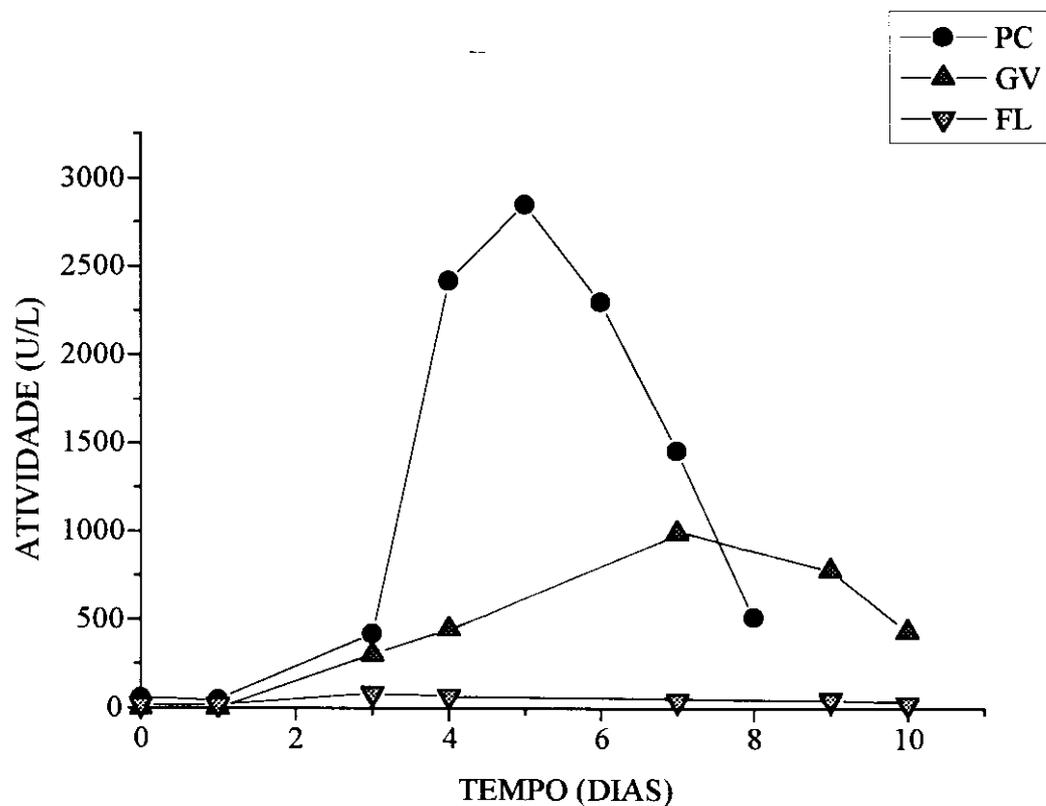


FIGURA 5.1.1 - Produção de lipase em Meio ME pelos fungos filamentosos *Penicillium citrinum* (PC) (●-●); *Gliocladium viride* (GV) (▲-▲) e *Fusarium lateritium* (FL) (▼-▼).
Condições experimentais ver 4.1.3; 4.2.1 e 4.2.6 b.

P. citrinum isolado como contaminante do óleo de oliva apresentou o máximo de produção de lipase (409 U/L), após 9 dias, quando cultivado no meio **ME** (óleo de oliva + extrato de levedura). Esta atividade foi três vezes maior que a obtida (151 U/L) usando o meio **MR** (amido + peptona + sais minerais), após 24 horas. Entretanto, após 15 dias de cultivo, a cultura mostrou uma atividade mais alta (605 U/L). Enquanto que, no meio **MG**, não houve atividade lipolítica detectável, sugerindo que o *P.citrinum* precisa de indutor (**FIGURA 5.2.1**).

Durante a produção de lipase, o pH inicial dos meios variaram de 6,0 a 7,8 (meio **ME**), 7,2 a 7,8 (meio **MR**) e 5,7 a 8,2 (meio **MG**). Entretanto no máximo de produção de lipase, no início da fase estacionária, o pH foi de 7,5 e de 6,9 nos meios **ME** e **MR**, respectivamente (**FIGURA 5.2.2**).

De acordo com SZTAJER e MALISZEWSKA (1989), a melhor condição para produção de lipase (1015 U/L) pelo *P.citrinum* isolado do solo em meio **MR** foi usando 5% (p/v) de peptona como fonte de nitrogênio e 2% (p/v) de amido como fonte de carbono, após 48h, a 22°C, com agitação (150 rpm). O pH foi de 7,2 no máximo da produção de lipase.

As atividades específicas obtidas para as lipases produzidas nos meios **ME** (259 U/mg proteínas) e **MR** (3,9U/mg proteínas, após 16 dias), mostraram que as proteínas extracelulares produzidas no meio **ME** foram mais específicas para lipase, que no meio **MR**. Baseados nestes resultados, razoável produção de lipase em meio simples e barato, decidimos otimizar o rendimento no meio **ME**.

De acordo com HAAS e col.(1992), o uso de triglicerídios como fonte de carbono causou turvação no meio e dificultou a purificação da enzima, devido a concentração de triglicerídios não hidrolisados. Eles estudaram a

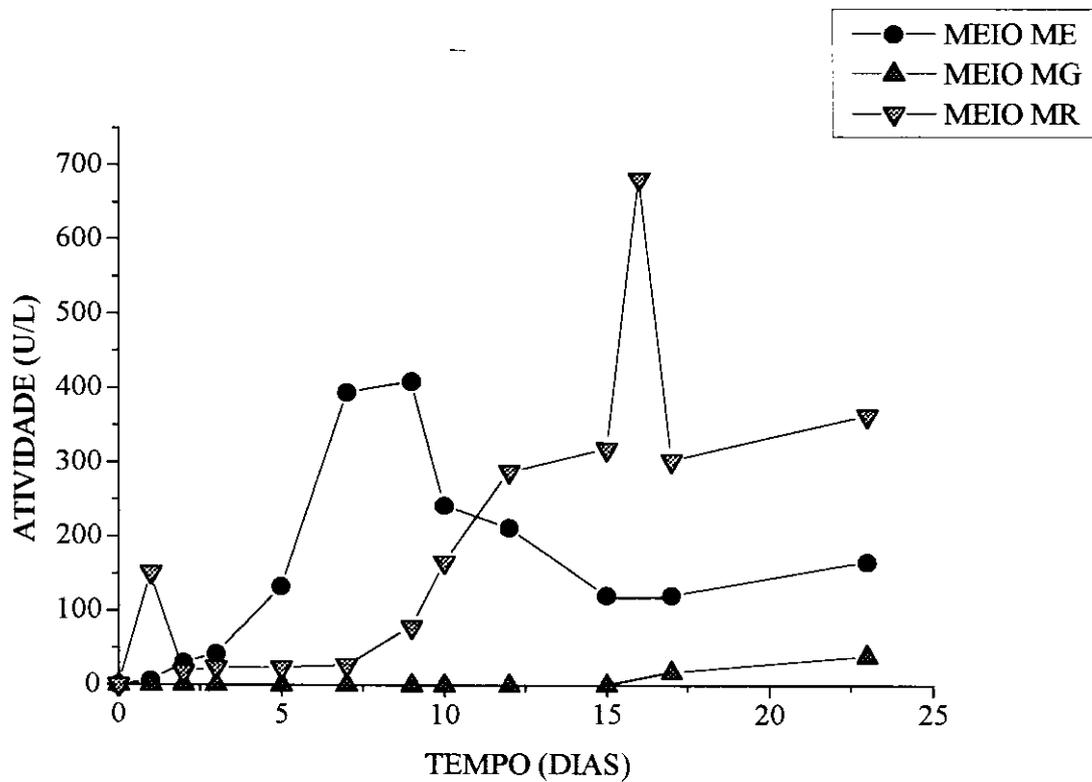


FIGURA 5.2.1 - Efeito da composição do meio de cultura na produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*.
 Meio com D-glucose (MG) (▲-▲); Meio com óleo de oliva (ME) (●-●) ; Meio rico (MR) (▼-▼).
 Condições experimentais ver 4.1.3; 4.2.1 e 4.2.6 b.

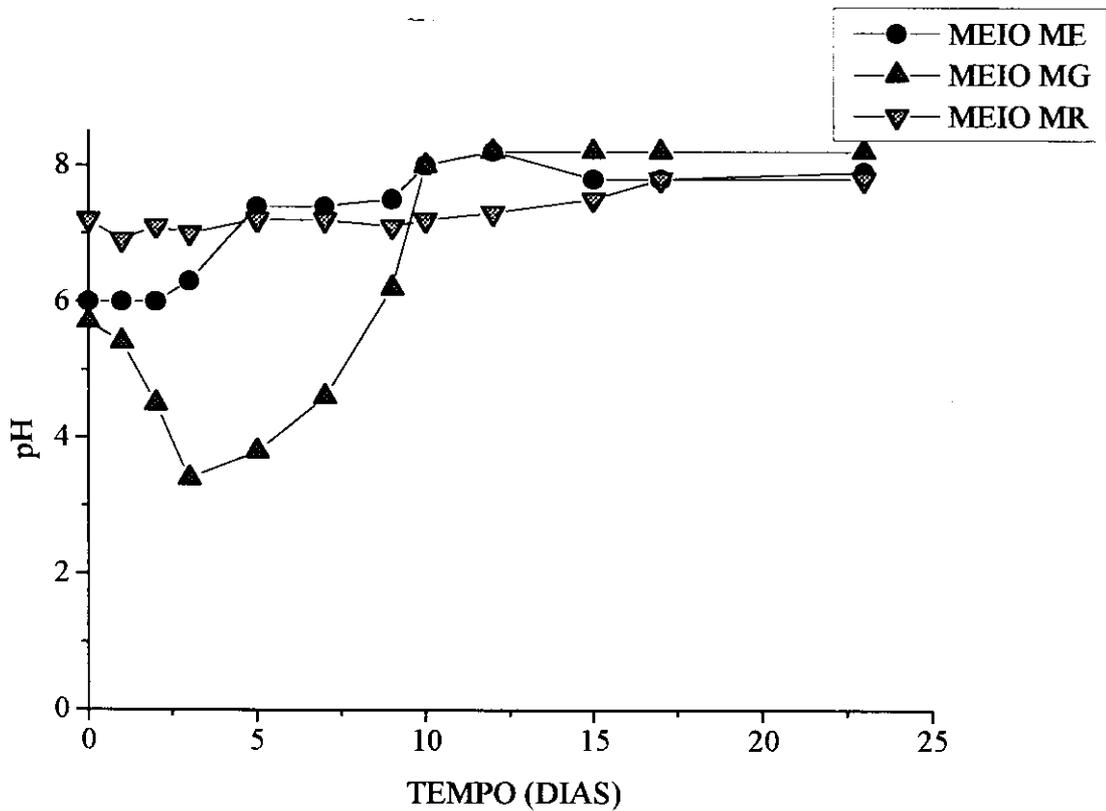


FIGURA 5.2.2 - Variação do pH durante a produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em diferentes meios de cultura. Meio com D-glucose (MG) (●-●); Meio com óleo de oliva (ME) (▲-▲); Meio rico (MR) (▼-▼). Condições experimentais ver 4.1.3 e 4.2.1.

produção de lipase de *Rhizopus delemar* em meio contendo aminoácidos, micro elementos e biotina diluídos num meio basal de sais minerais. Foi encontrado também que o glicerol foi tão eficiente quanto o triglicerídio como fonte de carbono para produção desta lipase. *P. citrinum* não produziu lipase na presença de glicerol como fonte de carbono. O meio **ME** é mais simples que o utilizado por HAAS e col.(1992), não foi observada nenhuma turvação no meio por causa do óleo de oliva. Além disto, obtivemos razoável recuperação da proteína do filtrado do meio de cultura.

Para otimizar a produção de lipase pelo *P.citrinum*, decidimos investigar o efeito da concentração da fonte de carbono e nitrogênio. Experimentos sobre a concentração de óleo de oliva no meio **ME**, mostraram que usando pré-inóculo crescido em meio com 0,2% (p/v) de D-glucose, o máximo de atividade lipolítica produzida em 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 % (v/v) de óleo de oliva foi 333 U/L (após 11 dias), 242 U/L (após 14 dias), 379 U/L (após 14 dias) e 212 U/L (após 17 dias), respectivamente (**FIGURA 5.2.3**). Todavia, quando as atividades lipolíticas específicas foram relacionadas (**TABELA 5.2**), a obtida em 0,2 % de óleo (0,368 U/mg proteínas) foi cerca de três vezes maior que a obtida em 1,0 % de óleo (0,097 U/mg proteínas). No entanto, com o pré-inóculo crescido no meio **ME**, contendo as respectivas concentrações de óleo de oliva, a produção de atividade lipolítica foi proporcional a concentração de óleo de oliva no meio de cultura.

Entretanto, utilizando pré-inóculos crescidos nas seguintes concentrações de óleo de oliva, 0,2; 0,4; 0,6 e 1,0 % (v/v), as atividades máximas foram respectivamente, 205 U/L (após 14 dias), 323 U/L (após 14 dias), 810 U/L (após 14 dias) e 2880 U/L (após 5 dias). Obtendo no meio com 1% de óleo de oliva uma atividade cerca de 8 vezes maior que a obtida anteriormente com 0,2%, usando pré-inóculo crescido em D-glucose (**FIGURA 5.2.4**).

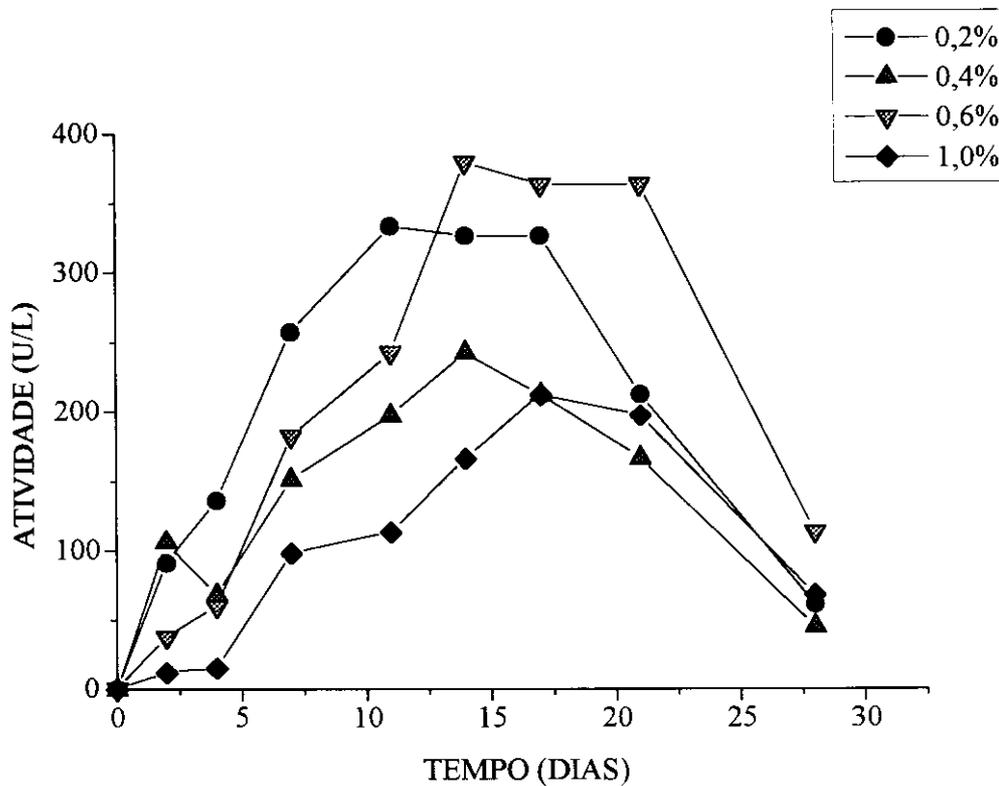


FIGURA 5.2.3 - Efeito da concentração de óleo de oliva na produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*, em Meio ME, utilizando pré-inóculos em Meio MG (0,2% de D-glucose). Meio ME contendo 0,2% (●-●); 0,4% (▲-▲); 0,6% (▼-▼) ou 1,0% (◆-◆) de óleo de oliva. Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3 e 4.2.6 b.

TABELA 5.2 - Efeito da concentração de óleo de oliva e condições de cultivo do pré - inóculo na produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*, em Meio ME.
Condições experimentais ver 4.2.3 e 4.2.6 b.

Pré-inóculos	Concentração de óleo de oliva (%)	Tempo para produzir o máximo de atividade (dias)	Atividade máxima (U/L) (U/mg Prot.)	
Células cultivadas nas respectivas concentrações de óleo de oliva	0,2	14	205	0,419
	0,4	14	323	0,577
	0,6	14	810	2080
	1,0	7	2880	3200
Células cultivadas em 0,2% D-glucose + 0,5% extrato de levedura	0,2	11	333	0,368
	0,4	14	242	0,258
	0,6	14	379	0,289
	1,0	14	212	0,097

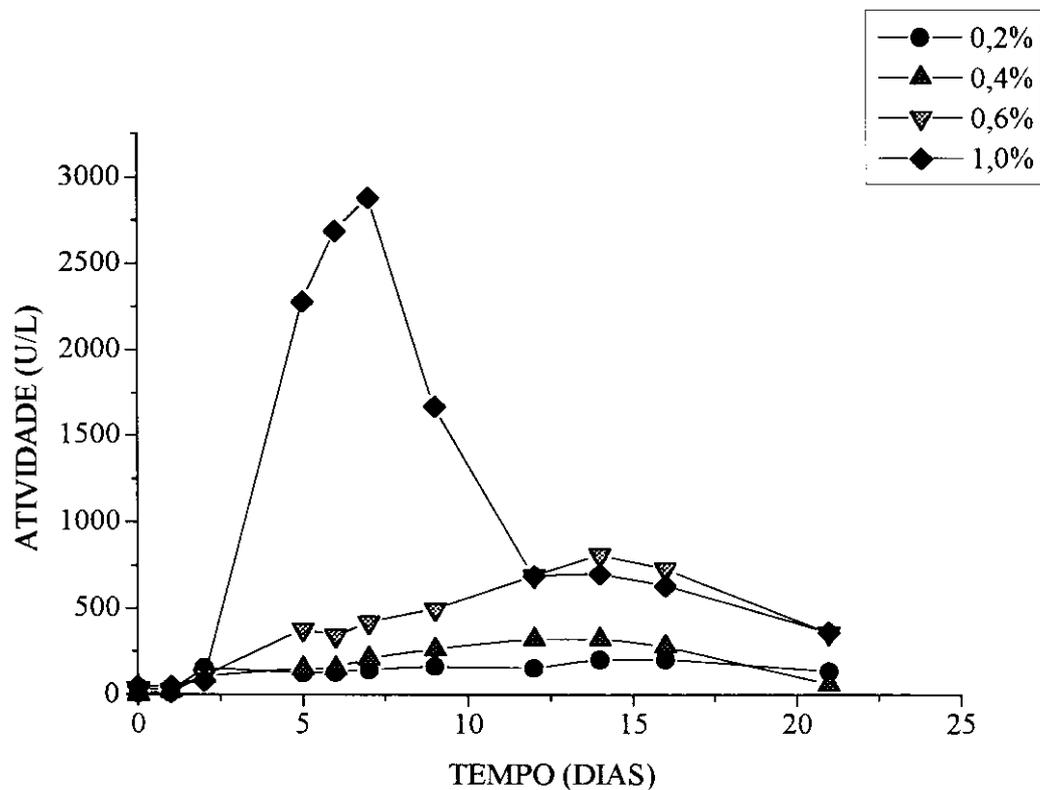


FIGURA 5.2.4 - Efeito da concentração de óleo de oliva na produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*, utilizando pré-inóculos nos respectivos Meios ME.

Meios ME contendo 0,2% (●-●); 0,4% (▲-▲); 0,6% (▼-▼) ou 1,0% (◆-◆) de óleo de oliva.

Condições experimentais ver 4.2.1 ; 4.2.3 e 4.2.6 b.

Este resultado poderia ser explicado, baseado no acúmulo de ácidos graxos livres no meio, resultando um desequilíbrio entre a produção de ácidos decorrente da hidrólise do óleo e o consumo celular durante a fermentação. De acordo com MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), a produção de lipase pode ser inibida por ácidos graxos livres. Foi observado que 0,1% de óleo de oliva estimulava a produção de lipases extracelulares, produzindo seis vezes mais que o normal, enquanto que a adição de ácido láurico causou inibição na produção.

As FIGURAS 5.2.5; 5.2.6 e 5.2.7 mostram que a produção de lipase é proporcional à biomassa. Baseados na dosagem de proteínas do meio de cultura usando-se 0,5% de extrato de levedura, concluímos que o microrganismo utilizava apenas 0,2% na fase logarítmica. Então investigamos a possibilidade de obter a mesma biomassa e conseqüentemente a mesma produção de lipase com 0,2% de extrato de levedura. Os resultados mostraram que, a biomassa obtida com 0,5% de extrato após 7 dias (9,9 g (peso seco)/L) foi maior que a obtida com 0,2% (7,57 g (peso seco)/L) e 30 vezes maior que a obtida com sulfato de amônio sem sais minerais (0,329 g (peso seco)/L), após 15 dias. O decréscimo na quantidade de extrato de levedura diminuiu a produção de lipase de 2880 U/L em 0,5% para 621 U/L em 0,2%. Não houve produção de lipase quando o extrato de levedura foi substituído por sulfato de amônio (0,2 ou 0,75%). A redução da biomassa e a não produção de lipase usando sulfato de amônio pode ter sido devido a falta de sais minerais essenciais para o crescimento celular, tais como, KH_2PO_4 , NaCl , MgSO_4 , ZnSO_4 e FeSO_4 .

Nestas condições, o meio simples ME, foi o melhor para produção de lipase de *P.citrinum*. Segundo SZTAJER e MALISZEWSKA (1989), sulfato de amônio não estimulou a produção de lipase pelo *P. citrinum* no

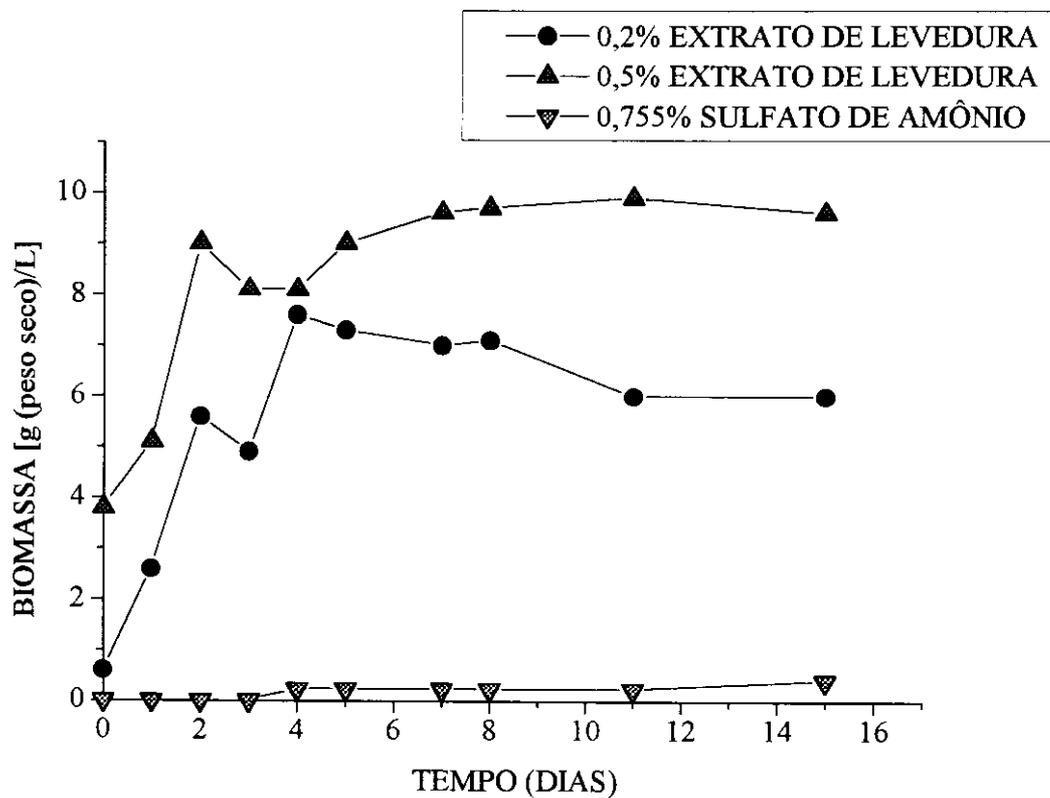


FIGURA 5.2.5 - Efeito da concentração de extrato de levedura e da fonte de nitrogênio na produção de biomassa do *Penicillium citrinum*.

Meio ME contendo 0,2% (●-●) ou 0,5% (▲-▲) de extrato de levedura e meio com sulfato de amônio (0,755%), como fonte de nitrogênio (▼-▼). Óleo de oliva como fonte de carbono. Condições experimentais ver 4.1.3; 4.2.2 e 4.2.3.

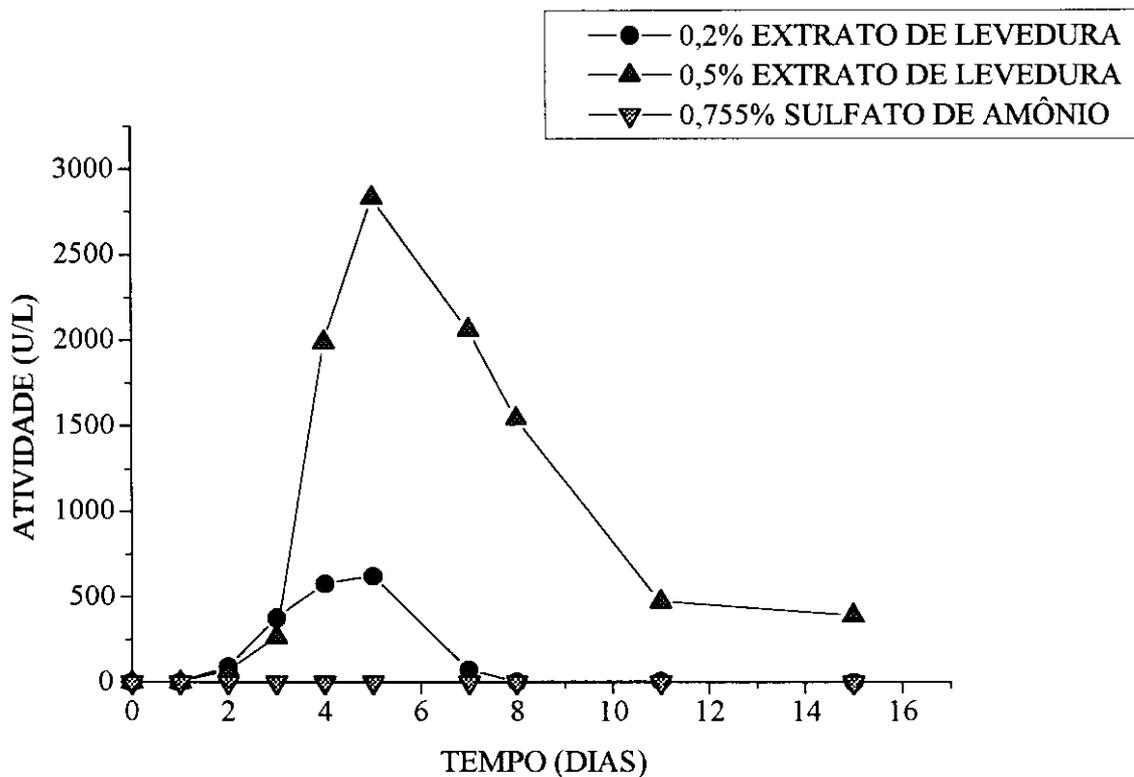


FIGURA 5.2.6 - Efeito da concentração de extrato de levedura e da fonte de nitrogênio na produção de lipase do *Penicillium citrinum*.

Meio ME contendo 0,2% (●-●) ou 0,5% (▲-▲) de extrato de levedura e meio com sulfato de amônio (0,755%), como fonte de nitrogênio (▼-▼). Óleo de oliva como fonte de carbono. Condições experimentais ver 4.1.3; 4.2.2 e 4.2.3.

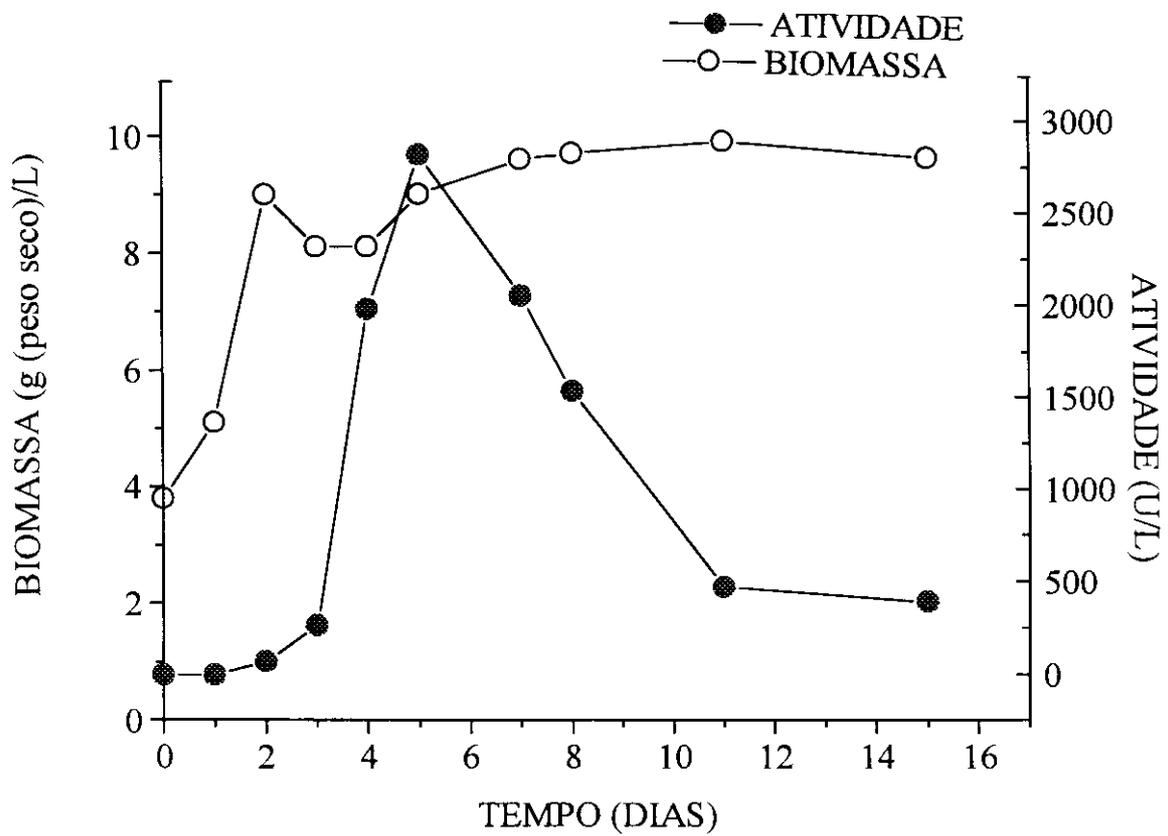


FIGURA 5.2.7 - Curva de crescimento celular e produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em meio ME. Atividade lipolítica (●-●) e biomassa (○-○). Condições experimentais ver 4.2.2 e 4.2.6 b.

meio MR, usando óleo de Canola (“rapeseed”), rico em trioleína, como indutor.

5.3. PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO *Penicillium citrinum* NO MEIO ME

Os experimentos sobre a produção de protease no meio ME (FIGURAS 5.3.1 e 5.3.2) mostraram que, a produção desta enzima foi proporcional à concentração de óleo de oliva, apresentando o máximo de atividade (57,4 U/L), no mesmo tempo do máximo de produção de lipase (2880 U/L), nas mesmas condições de cultivo. A produção de protease foi maior no meio contendo 0,5% de extrato de levedura. Não houve produção de protease quando o extrato de levedura foi substituído pelo sulfato de amônio.

Os experimentos com os inibidores de protease, demonstraram que o *P.citrinum* produz uma serina protease no meio ME. O PMSF inibiu a protease em 91,2% enquanto que não houve inibição pelo EDTA. Apesar da presença de protease no filtrado bruto do meio de cultura, a atividade lipolítica foi conservada durante 35 dias a 4°C, sem adição de inibidor de protease (FIGURA 5.8.11).

KOHNO e col. (1994) têm investigado a produção de lipases pelo *Rhizopus niveus* IFO 4759, em meio contendo peptona (5%) e D-glucose (2%). Após 4 dias de cultivo a 27°C e pH 6,0, foi produzido dois tipos de lipases (I e II). Entretanto, os resultados utilizando inibidor de serina proteases sugeriram que a lipase II era resultante da hidrólise parcial da lipase I por uma serina protease específica durante a fermentação.

Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por HENRIETTE

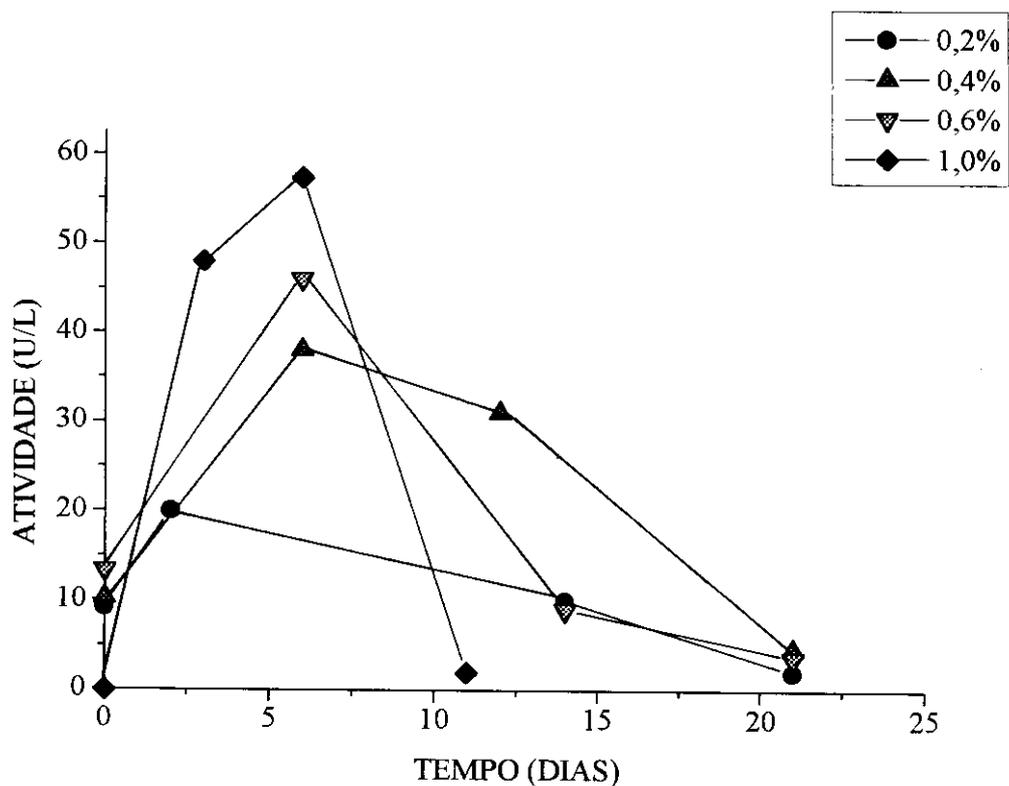


FIGURA 5.3.1 - Efeito da concentração de óleo de oliva na produção de protease pelo *Penicillium citrinum* em Meio ME. Pré - inóculos crescidos nos respectivos Meios ME, contendo 0,2 % (●-●); 0,4% (▲-▲); 0,6% (▼-▼) ou 1,0% (◆-◆) de óleo de oliva. Condições experimentais ver 4.2.3 e 4.2.6 d.

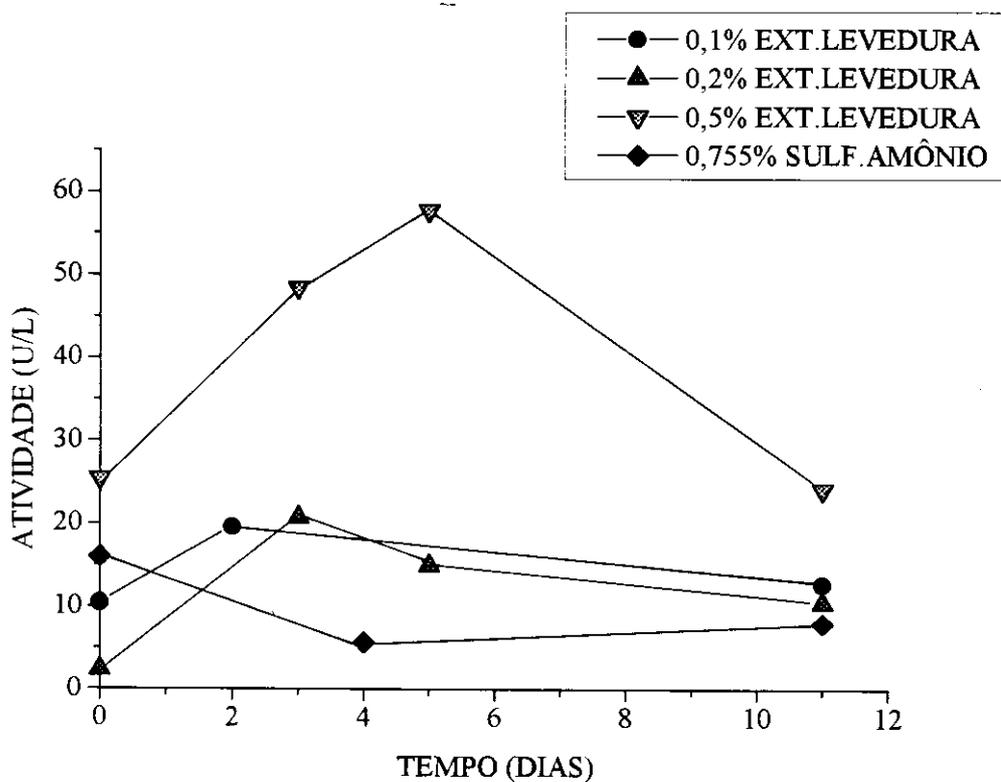


FIGURA 5.3.2 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção de protease pelo *Penicillium citrinum*.

Meio ME contendo 0,1% (●-●) ou 0,2% (▲-▲) ou 0,5% (▼-▼) de extrato de levedura e em meio com sulfato de amônio (0,755%), como fonte de nitrogênio (◆-◆). Óleo de oliva como fonte de carbono.

Condições experimentais ver 4.2.3 e 4.2.6 b.

e col. (1993), em relação a produção de exolipase e exoprotease pela *Serratia marcescens* 532S, que foi fortemente influenciada pela composição do meio de cultura, no qual os nutrientes atuaram como indutores ou repressores da produção destas enzimas. Utilizando fermentação em bateladas, tanto a lipase como a protease, foram produzidas logo após a fase exponencial de crescimento. Lipídios ou Tween 80 estimularam a produção de lipase, enquanto que NH₄Cl ou aminoácidos simples inibiram a produção de protease. A síntese de protease foi inversamente proporcional a concentração de D-glucose no meio de cultura.

5.4. PRODUÇÃO DE LIPASE PELO *Penicillium citrinum* NO MEIO MA

O máximo de atividade lipolítica (1585 U/L) foi obtido quando *Penicillium citrinum* foi cultivado em 0,75% de sulfato de amônio complementado com sais minerais (MA), de acordo com COX e THOMAS (1991), em vez de extrato de levedura (ME) (FIGURA 5.4.1).

Embora a atividade relativa tenha sido 55% da produzida em meio ME (2850 U/L), a atividade específica (7,8 U/mg de proteínas) foi maior que a obtida com extrato de levedura (4,9 U/mg de proteínas) (FIGURA 5.4.2).

Estes resultados mostraram que a lipase produzida em sulfato de amônio está livre de proteases produzidas pelo microrganismo e de proteínas que participam da composição do meio de cultura, além de produzir um extrato enzimático bruto menos pigmentado que o obtido com o extrato de levedura. Importante para sua aplicação em sabão em pó e em síntese orgânica. A diferença dos extratos enzimáticos brutos foi observada através de eletroforese SDS-PAGE, na qual a proteína produzida em sulfato de amônio apresentou menos bandas que a produzida em extrato de levedura.

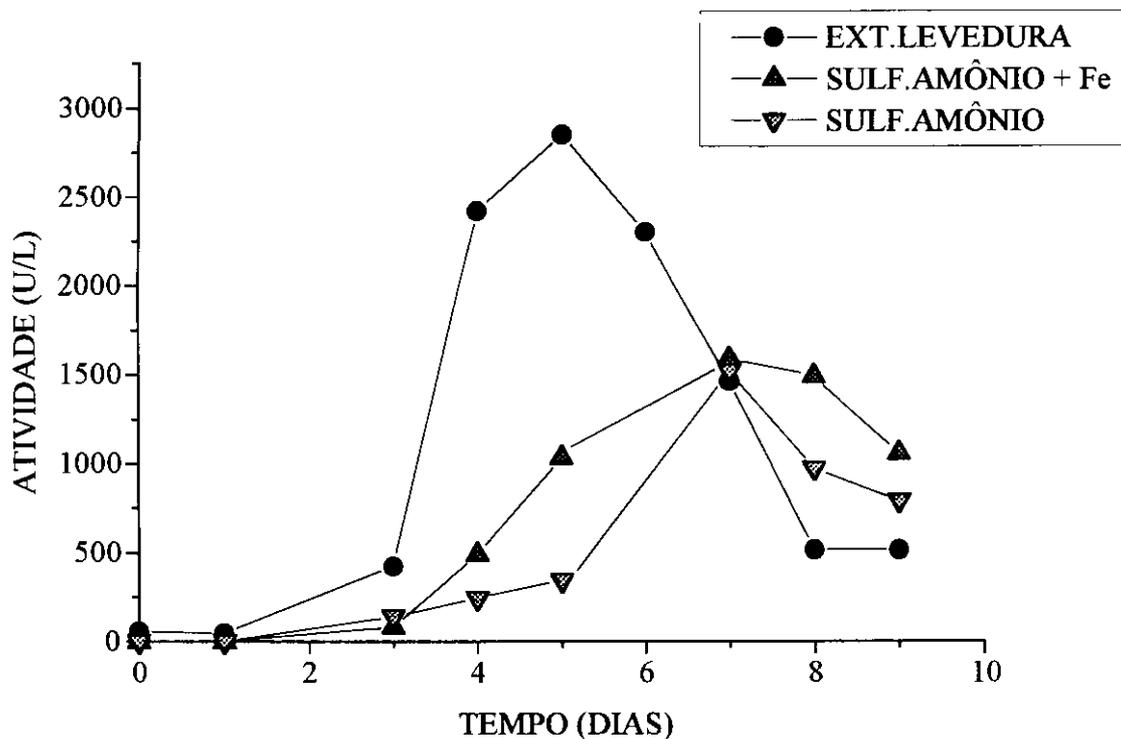


FIGURA 5.4.1 - Efeito da fonte de nitrogênio e da presença de íons Fe^{++} na produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*. Meio ME, 0,5% de extrato de levedura (●-●); Meio MA, 0,755% de sulfato de amônio + Fe^{++} (▲-▲) ou 0,755% de sulfato de amônio (▼-▼). Condições experimentais ver 4.2.3 d; 4.2.1 e 4.2.6.2.

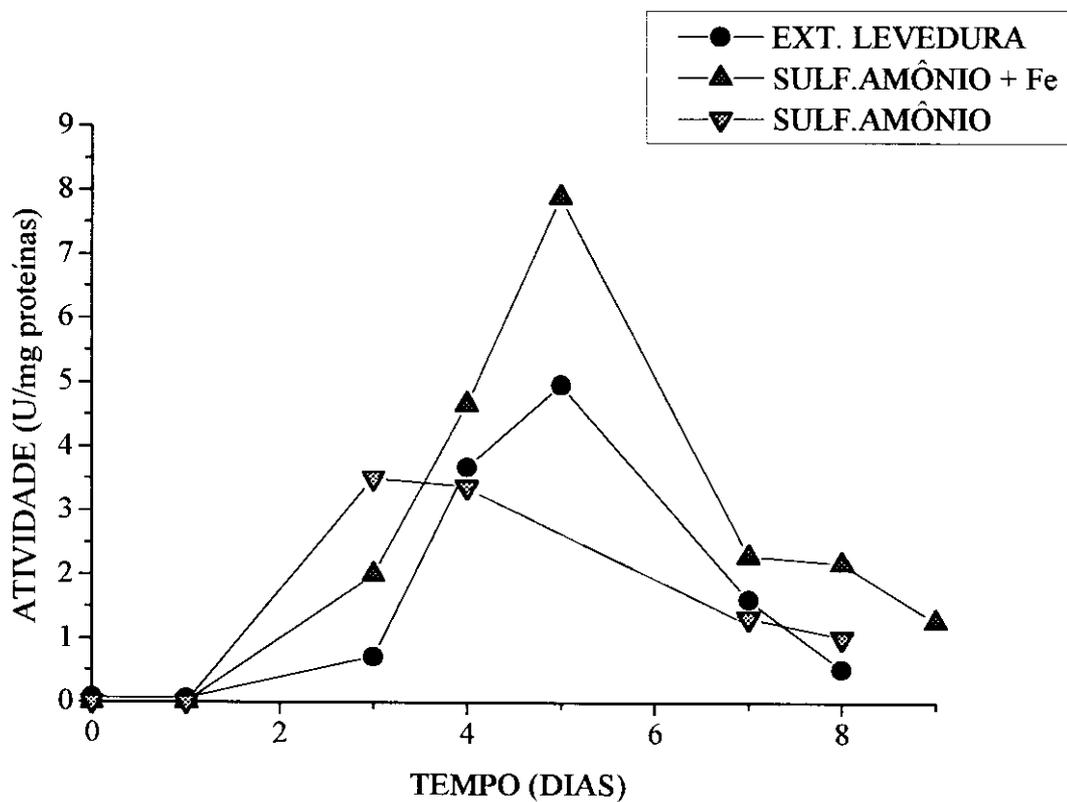


FIGURA 5.4.2 - Produção de atividade lipolítica específica pelo *Penicillium citrinum* em diferentes fontes de nitrogênio. Meio ME, 0,5% de extrato de levedura (●-●); Meio MA, 0,755% de sulfato de amônio + Fe⁺⁺ (▲-▲) ou 0,755% de sulfato de amônio (▼-▼). Condições experimentais ver 4.2.3 d; 4.2.1 e 4.2.6.2.

A produção de lipase pelo *P.citrinum* em meio **MA** precisa de íons ferro, desde que a ausência deste íon no meio de cultura causou uma redução de 50% na atividade específica (3,5 U/mg de proteínas) (**FIGURA 5.4.2**). Este resultado não está de acordo com o encontrado para a produção de lipase de *Pseudomonas fluorescens*, a qual foi inibida pela presença de íons ferro (ISHIHARA e col., 1989). De acordo com MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), a adição de FeSO₄ à mistura de reação, no início da incubação, causou inibição na atividade lipolítica de *P. citrinum*.

Experimentos posteriores mostraram um decréscimo na produção de lipase com a redução da concentração de sulfato de amônio de 1585 U/L (0,75%) a 1290 U/L (0,5%) e 1020 U/L (0,35%) (**FIGURA 5.4.3**).

O pH inicial do meio de cultura **MA** variou de 4,5 a 2,3 sendo 2,6 no máximo de produção de atividade lipolítica extracelular. Experimentos ajustando o pH para 6,5 com NaOH 0,1M ou usando tampão fosfato de potássio 50 ou 100 mM, não apresentou atividade lipolítica extracelular, embora tenha apresentado bom crescimento.

Sugerindo que o pH do meio tem grande influência sobre a produção e liberação da lipase de *P. citrinum* no meio **MA** (**FIGURA 5.4.4**).

Dentre os fungos filamentosos testados por HOU (1994), para produção de lipase usando meio de batata-dextrose com óleo de soja como substrato, *P. citrinum* NRRL 6336 produziu lipase apenas a pH 7,5 enquanto que as cepas NRRL 2140, 3 754 e 5907 produziram lipase em pH 7,5 e 5,5 a 25°C.

Nenhuma das cepas de *P. citrinum* foi capaz de produzir lipase em pH 9,0 a 60°C. Tem sido observado que a temperatura de cultivo pode regular a produção de diferentes enzimas em vários níveis. GUILLOU e col. (1995) obtiveram o máximo de produção de lipase e protease extracelulares por

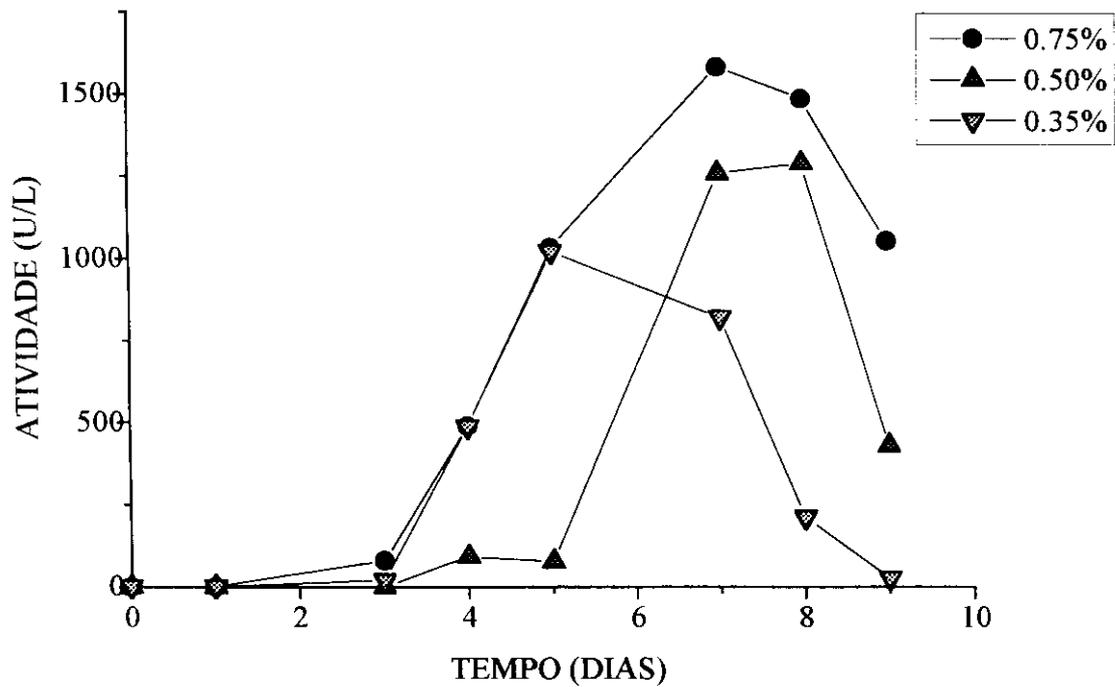


FIGURA 5.4.3 - Efeito da concentração de sulfato de amônio na produção de lipase em meio **MA**.
 Meio **MA**, contendo diferentes concentrações de sulfato de amônio: 0,755% (●-●); 0,50% (▲-▲) e 0,35% (▼-▼).
 Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 b.

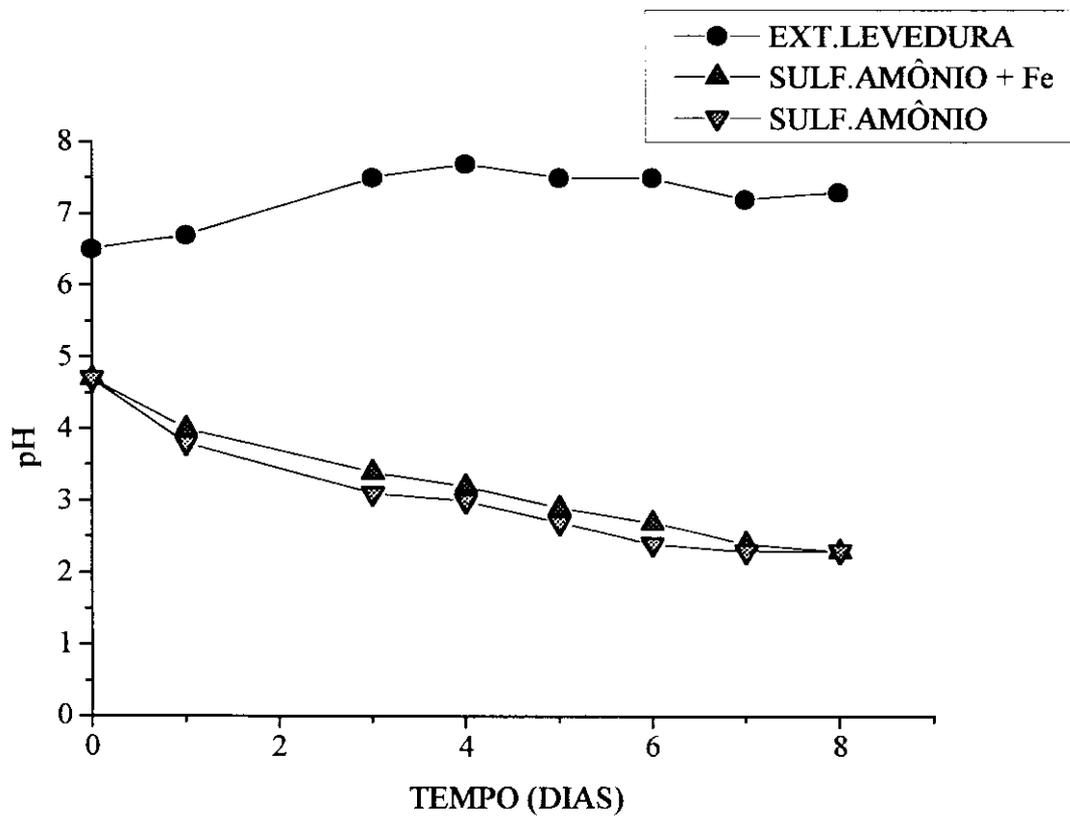


FIGURA 5.4.4 - Variação de pH durante a produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em Meio ME e MA.

Em Meio ME (●-●) e Meio MA com Fe^{++} (▲-▲) e sem Fe^{++} (▼-▼).

Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 b.

uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, geneticamente manipulada para produzir estas enzimas, a 17°C.

Lipases de *P.citrinum* têm sido produzidas em pH 7,2, usando peptona como fonte de nitrogênio (SZTAJER e MALISZEWSKA, 1989).

CRUZ e col. (1993) elaborou uma otimização estatística para produção de lipase de *Rhizopus delemar*, usando fontes industriais de carbono e nitrogênio. Pasta de soja e dextrina foram selecionadas como melhores fontes de carbono e nitrogênio. O máximo de produção de lipase foi obtido após 2 dias de fermentação, a qual foi 12 vezes maior com o meio otimizado (13,6 U/mL). Os resultados sugeriram que, a relação entre fonte de carbono (C) e fonte de nitrogênio (N) era muito importante para a produção de lipase, desde que, foi obtido um aumento na produção da enzima quando esta relação foi mudada de 1:1 para 1:2 (C:N).

A morfologia do fungo foi afetada pela composição do meio de cultura, apresentando em forma esférica, sólidas, ocas ou cheias de óleo de oliva, na superfície do líquido, quando em meio **ME** enquanto que no meio **MA** as esferas foram menores, filamentosas e uniformemente suspensas no meio.

Quando o pH do meio **MA** foi ajustado para 6,5 com NaOH, as características foram as mesmas obtidas no meio **ME** e com tampão a mesma que no meio **MA** a pH 4,5 (**FIGURA 5.4.5**). Isto mostra que o pH é um importante parâmetro para mudar a morfologia do fungo, podendo facilitar a fermentação em larga escala. Esta mudança de morfologia devido as condições de cultivo, também foram observadas por NIELSEN e KRABBEN (1995), quando cultivaram *Penicillium chrysogenum* em culturas submersas, alterando a velocidade de crescimento. Assim sendo, as cinéticas de crescimento deste fungo em meio de cultura



B

A

FIGURA 5.4.5 - Morfologia do *Penicillium citrinum* durante a produção de lipase em Meio MA em diferentes valores de pH. pH inicial 4,5 (A) e pH 6,5, ajustado com NaOH 1N (B). Condições experimentais 4.2.3.

definido foi diferentes da obtida com o meio complexo. A velocidade de crescimento das hifas elementares foi maior e a frequência de ramificação foi menor, no meio complexo. E também por PAUL e col. (1994), a partir dos estudos morfológicos, utilizando o mesmo fungo, observaram que pode ocorrer uma variação na espessura da parede das hifas e a formação de vacuolos durante a fermentação, dependendo das condições de cultivo. Eles sugeriram que estas variações morfológicas podem ser uma forma do microrganismo se proteger das variações das condições experimentais.

O uso de óleos comerciais como fonte de carbono, em meio **MA**, tais como, óleo de soja (236 U/L) ou de milho (74 U/L), mostrou que o óleo de oliva foi a melhor fonte de carbono e indutor para produção de lipase pelo *P. citrinum* (1585 U/L), devido seu alto teor de trioleína (**FIGURA 5.4.6**).

Experimentos em meio **MA**, utilizando um subproduto da refinaria de óleos vegetais, contendo 60% de matéria graxa, como fonte de carbono e indutor mostraram uma produção de lipase (5875 U/L) pelo *P. citrinum*, melhor que a obtida anteriormente utilizando óleo de oliva (3625 U/L), atividades obtidas pelo método colorimétrico do cobre (**FIGURAS 5.4.7; 5.4.8 e 5.4.9**). O pH inicial variou de 8,0 a 3,0, sendo igual a 7,0 no máximo da produção de lipase, após 24h de cultivo.

Entretanto, houve grande produção de uma substância extracelular a qual emulsificou a gordura do meio, causando turvação durante a fermentação (**FIGURA 5.4.10**). Talvez, esta turvação esteja relacionada com a produção de algum bioemulsificante pelo *P. citrinum*, uma vez que este subproduto contém 60% de lipídios e 35% de carboidratos. Fontes de carbono utilizadas por ZHOU e KOSARIC (1995) para a produção de um bioemulficante glicolipídico por *Candida bombicola*. O meio de cultura de baixo custo, era composto por óleo de Canola (lipídio) e um subproduto de

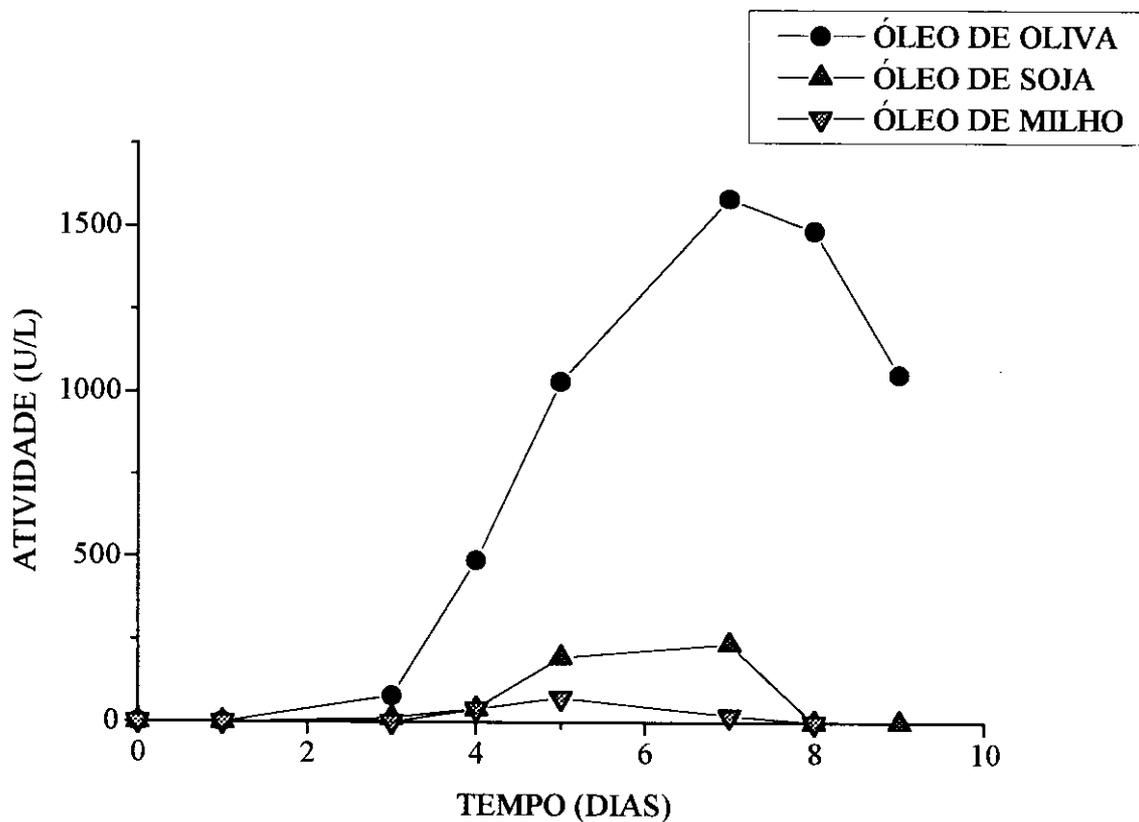


FIGURA 5.4.6 - Efeito do tipo de óleos comerciais sobre a produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em Meio MA.

Óleo de oliva 1% (●-●); Óleo de soja 1% (▲-▲) e óleo de milho 1% (▼-▼).

Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 b.

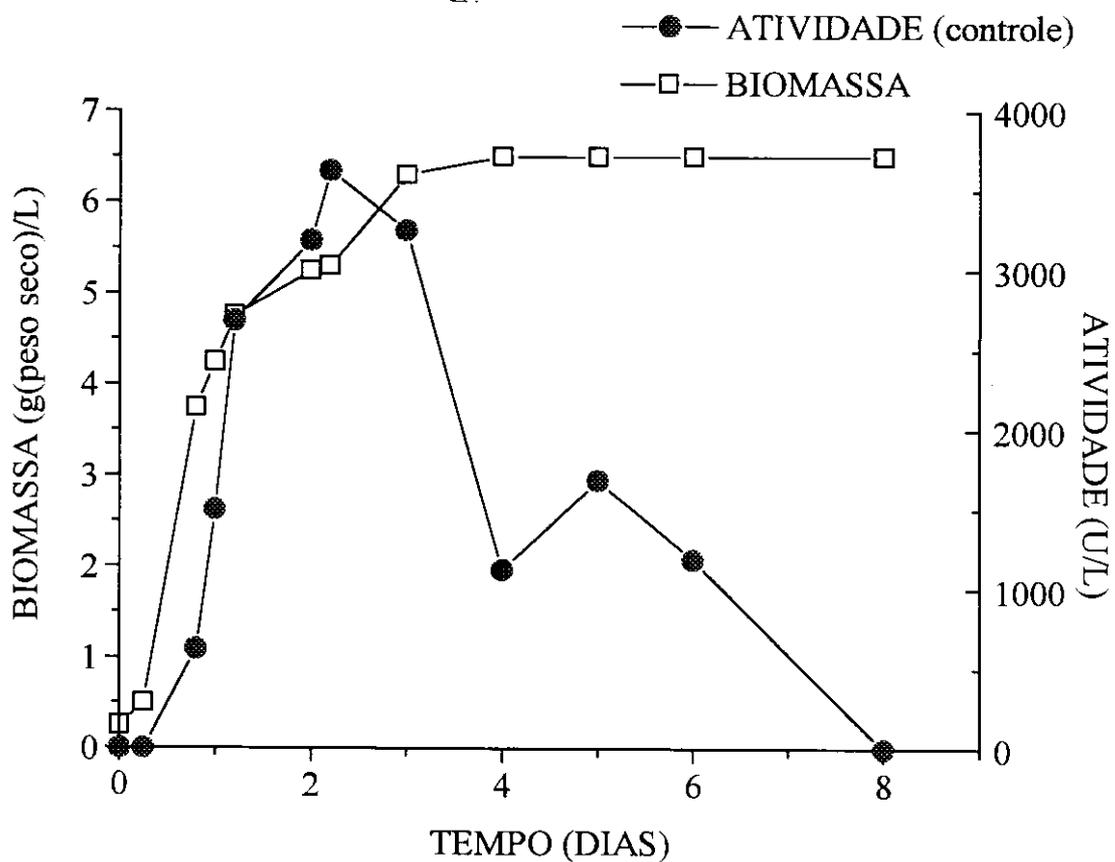


FIGURA 5.4.7 - Curva de crescimento e produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em Meio **MA**. Óleo de oliva como fonte de carbono. Atividade lipolítica pelo Método do cobre (●-●) e biomassa (□-□). Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 c.

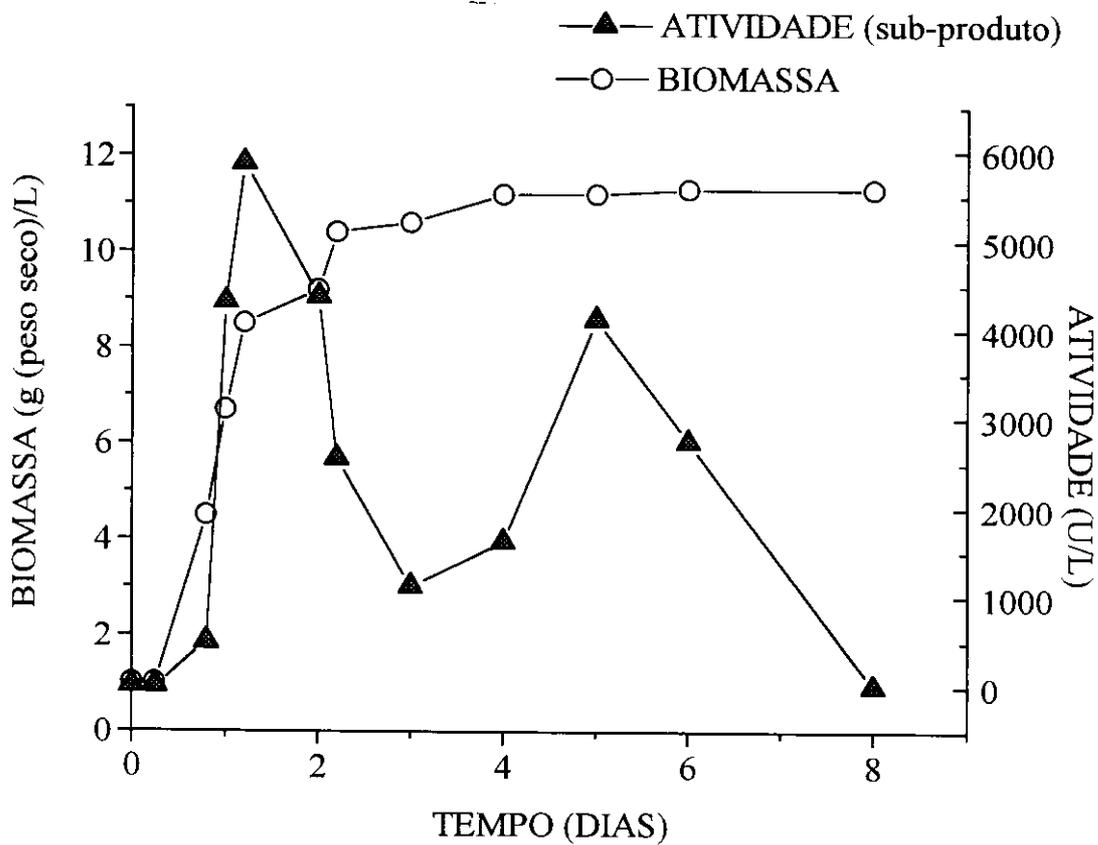


FIGURA 5.4.8 - Curva de crescimento e produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* Meio MA, contendo o subproduto da refinaria de óleos vegetais, como fonte de carbono. Atividade lipolítica pelo Método do Cobre (▲-▲) e biomassa (O-O). Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 c.

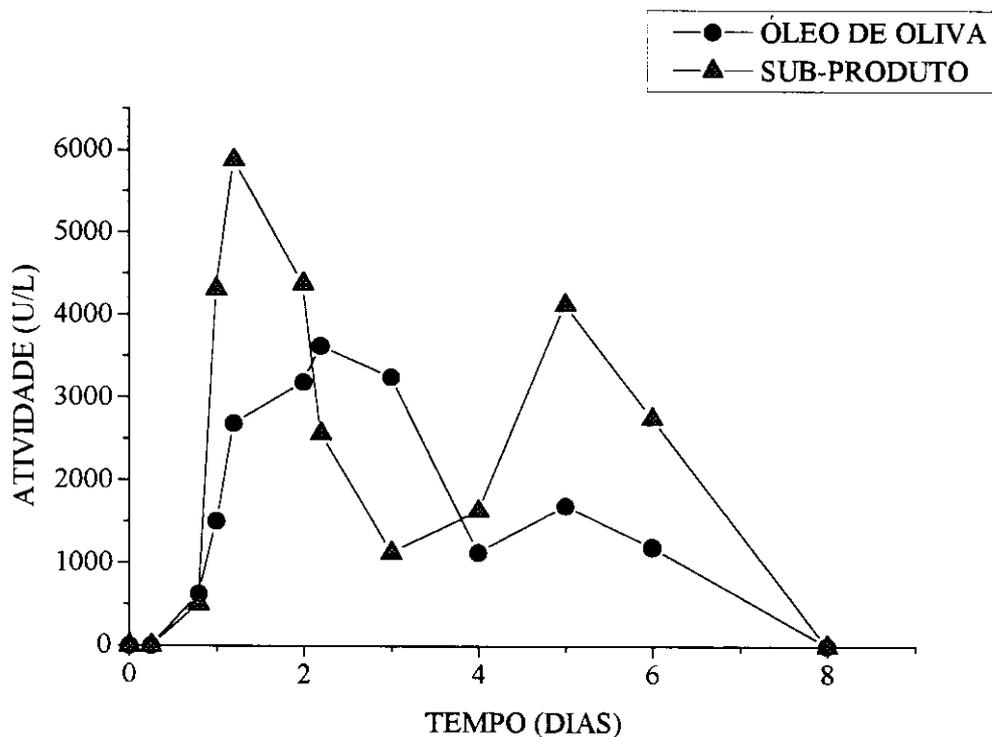


FIGURA 5.4.9 - Produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em Meio MA, contendo óleo de oliva ou subproduto da refinaria de óleos vegetais, como fonte de carbono. Óleo de oliva (●-●); subproduto da refinaria de óleos vegetais (▲-▲). Atividade lipolítica pelo Método do cobre. Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 c.

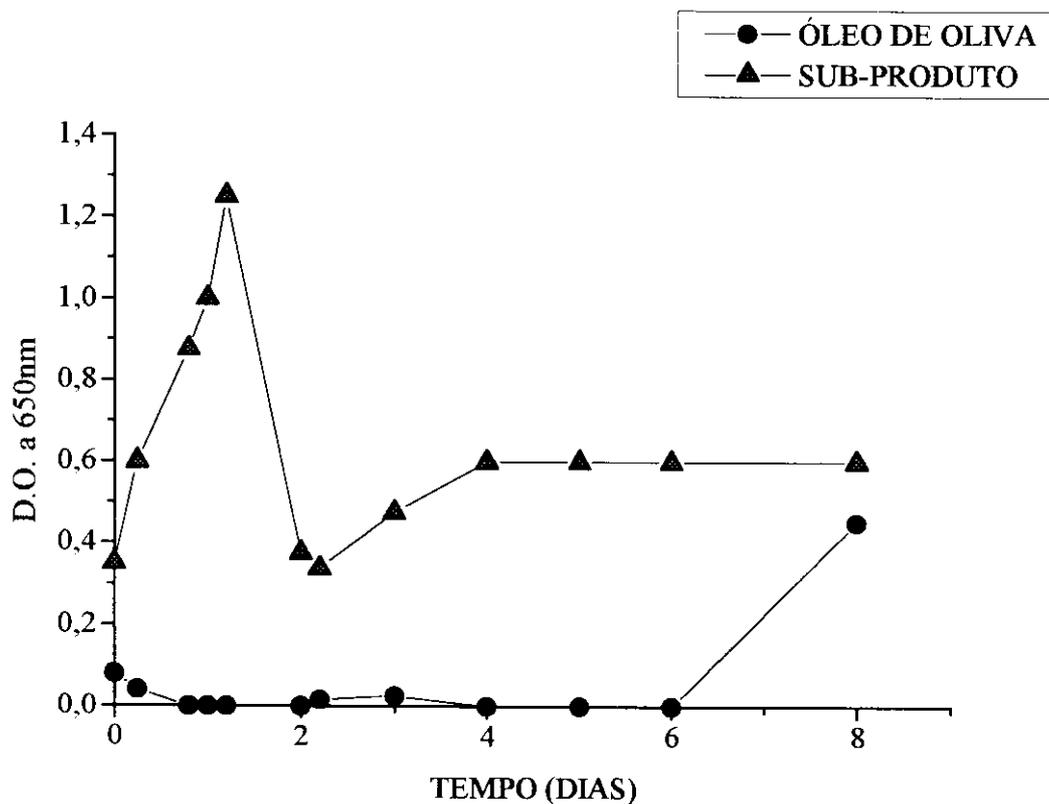


FIGURA 5.4.10 - Turbidez do filtrado bruto do meio de cultura (MA), durante a produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*, em presença do óleo de oliva ou do subproduto da refinaria de óleos vegetais. Óleo de oliva (●-●); subproduto da refinaria de óleos vegetais (▲-▲). Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 c.

uma indústria de laticínios contendo lactose (carboidrato), como fontes de carbono, e uréia e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. O glicolípido foi obtido após 5-7 dias de cultivo a 30°C com agitação (450 rpm), com rendimento de 73% com óleo de Canola ou 50% com óleo de girassol.

Tem sido publicado, que o óleo de canola (“rapeseed”), com alto teor de trioleína, foi o melhor indutor para produção de lipase de *P. citrinum* isolado do solo (SZTAJER e MALISZEWSKA, 1989).

Segundo MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), óleo de oliva, ácido oléico e Tween 80 estimularam a produção de lipase enquanto o ácido láurico causou inibição. Resultados similares, em relação ao Tween 80 foram obtidos por CHANG e col.(1994) com a produção de lipase por *Candida rugosa*, na qual Tween 80 e Tween 20 promoveram um aumento na produtividade de lipase de 2,9 e 5,7 vezes, respectivamente. Ocorreu também uma variação na produção de múltiplas formas desta lipase, Tween 80 estimulou a produção de lipase C, enquanto que Tween 20 a de lipase B.

Os resultados obtidos por POKORNY e col. (1994), mostraram que *Aspergillus niger* produziu lipase na ausência de lipídios, embora o rendimento tenha sido melhor na presença de um indutor. A concentração e fonte do indutor não foram significativas, uma vez que amido em baixas concentrações estimulou a produção.

OHNISHI e col. (1994) determinaram as condições ótimas para a produção de lipase pelo *Aspergillus niger*, obtendo 0,46 U/L após 96h utilizando 2% de D-glucose e 1% de extrato de levedura e 2% de polipeptona como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. No pH inicial de 5-6 e 28°C com agitação (120 rpm). A produção de lipase

aumentou para 0,78 U/L, quando 3% de óleo de soja foi usado como indutor. Os resultados obtidos sugeriram que a lipase de *Aspergillus niger* é constitutiva e que ocorreu a produção de duas lipases com diferentes especificidades.

A **FIGURA 5.4.11** mostra o efeito da concentração de fosfato de potássio na produção de lipase pelo *P. citrinum* em meio **MA**. O máximo de atividade foi obtido usando 1 mM (1585 U/L), 10 mM (1290 U/L) e 30 mM (1238 U/L) de KH_2PO_4 . A produção não foi boa quando usamos 50 mM (195 U/L) e 100 mM (2 U/L). A adição de potássio a mistura de reação, numa concentração de 1M, não afetou a atividade da lipase de *P. citrinum* (MALISZEWSKA e MASTALERZ, 1992).

A produção de lipase por *Aspergillus niger* foi baixa na ausência de KH_2PO_4 , e a partir de 0,05% (3,7mM) foi aumentando, atingindo o melhor rendimento com 0,2% (14,7 mM) adicionando NH_4NO_3 , como fonte de nitrogênio, complementado com íons Mg^{++} no pH inicial de 5,0. Na ausência de KH_2PO_4 a melhor produção de lipase foi obtida usando peptona como fonte de nitrogênio (POKORNY e col., 1994).

A turvação no meio de cultura foi alta quando usamos baixas concentrações de KH_2PO_4 (1,10 e 30mM), do mesmo modo que a atividade lipolítica. Talvez, a síntese deste produto secundário esteja ligado a produção e liberação da lipase, uma vez que, no meio com altas concentrações de KH_2PO_4 foi obtido menor turvação e produção de lipase (**FIGURAS 5.4.11 e 5.4.12**). Nenhuma turvação foi detectada com o meio **ME**, em nossos experimentos.

5.5. EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SOBRE A PRODUÇÃO DA MICOTOXINA CITRININA

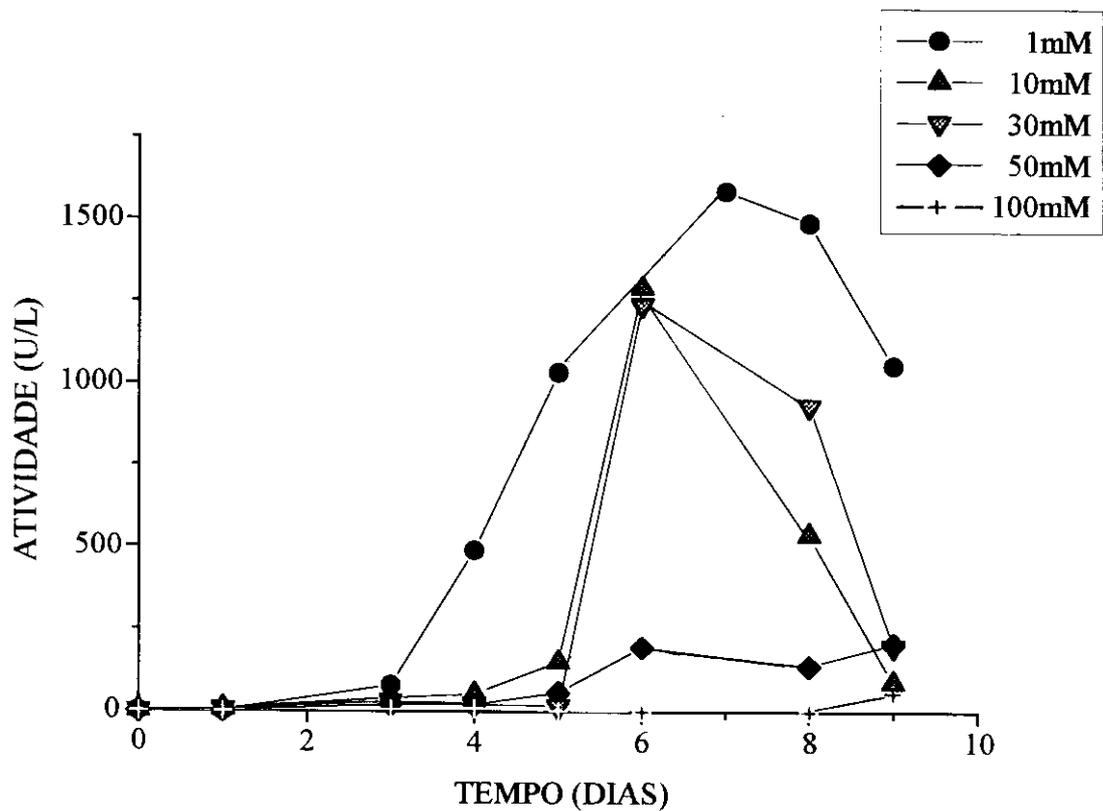


FIGURA 5.4.11 - Efeito da concentração de KH_2PO_4 na produção de lipase *Penicillium citrinum* em Meio MA.

Foram utilizadas as seguintes concentrações: 1 mM (●-●); 10 mM (▲-▲); 30 mM (▼-▼); 50 mM (◆-◆); 100 mM (+ - +).

Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3; 4.2.6 b.

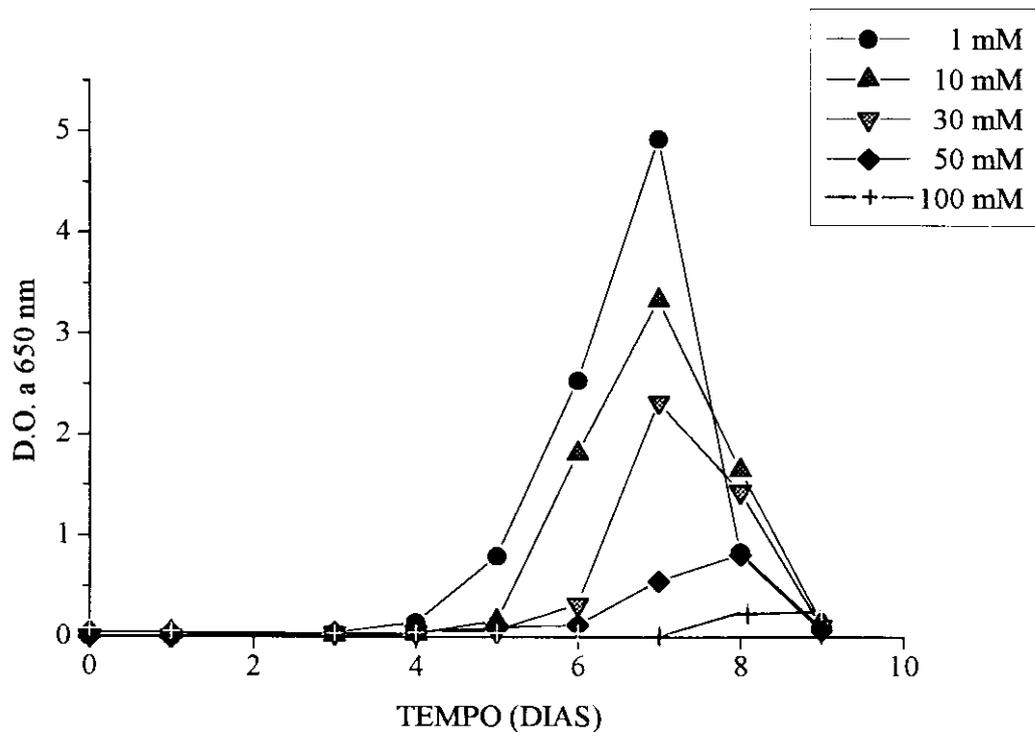


FIGURA 5.4.12 - Turbidez do filtrado bruto do meio de cultura (MA), durante a produção de lipase contendo diferentes concentrações de KH_2PO_4
 Concentrações de KH_2PO_4 : 1 mM (●-●); 10 mM (▲-▲); 30 mM (▼-▼); 50 mM (◆-◆); 100 mM (+ - +).
 Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.3.

A produção da micotoxina citrinina pelo *P.citrinum* é mostrado na **TABELA 5.5**. A produção diminuiu 37% quando usamos óleo de oliva em vez de glicerol como fonte de carbono em meio com extrato de levedura.

Estes resultados concordam com os obtidos usando o meio tradicional contendo D-glucose e extrato de levedura para produção de citrinina (VINÃS e col., 1993).

Não houve produção de citrinina detectável no meio com óleo de oliva como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, em baixas concentrações de fosfato de potássio e baixo pH.

Entretanto, quando o pH aumentou de 4,5 para 6,5 usando tampão fosfato de potássio 50 (5,91 µg/ml) ou 100 mM (9,9 µg/ml) a concentração de citrinina foi proporcional à concentração do tampão utilizado, sendo quase 2 vezes maior com o tampão a 100mM.

Quando o óleo de oliva foi substituído por óleo de soja ou de milho, a produção de citrinina foi baixa ou não detectável a pH 4,5, mas quando o pH do meio foi 6,5, usando o tampão fosfato de potássio 50 mM, a produção foi cerca de 2 vezes maior que a obtida com óleo de oliva nas mesmas condições.

Estes resultados mostram que tanto o pH do meio como a concentração de fosfato de potássio e o tipo de óleo afetam a produção de citrinina pelo *P.citrinum*. Logo, o meio **MA** é o melhor para produção de lipases livre de citrinina (**FIGURAS 5.5.1 e 5.5.2**).

5.6. PRODUÇÃO DE LIPASE PELO *Penicillium citrinum* EM FERMENTAÇÃO EM BATELADAS ALIMENTADAS (“Fed-Batch”)

Experimentos de fermentação em bateladas alimentadas (**fed-batch**)

TABELA 5.5 - Produção de citrinina ($\mu\text{g/mL}$ de meio de cultura) pelo *Penicillium citrinum* em diferentes meios de cultura e pH.

Condições experimentais ver 4.2.3, 4.2.6 b, 4.2.8.

Meio de cultura	Glicerol	Óleo de oliva	Óleo de soja	Óleo de milho	Lipase (U/mL)
ME (pH 6,5)	3,62	2,28	-----	-----	2,85
MA (pH 4,5)	-----	0,00	1,28	0,00	1,58
MA (pH 6,5)-50mM*	-----	5,91	13,99	14,42	0,07
MA (pH 6,5)-100mM*	-----	9,90	-----	-----	0,09

* Tampão fosfato de potássio.



P **ME** **MGO** **MA1** **MA2**

FIGURA 5.5.1 - Produção de citrinina pelo *Penicillium citrinum* em diferentes meios de cultura e pH.

Padrão produzido em 2% de D-glucose e 0,5% de extrato de levedura (**P**); Meio **ME** (**ME**); Meio **ME** com glicerol (**MGO**); Meio **MA** em tampão fosfato de potássio pH 6,5 a 50 mM (**MA1**) e 100 mM (**MA2**).

Condições experimentais ver 4.2.3; 4.2.8.



P **MAS** **MAM** **MA** **MAs** **MAm**

FIGURA 5.5.2 - Produção de citrinina pelo *Penicillium citrinum* com diferentes óleos vegetais como fonte de carbono. Padrão produzido em 2% de D-glucose e 0,5% de extrato de levedura (**P**); Meio **MA** em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5, contendo óleo de soja (**MAS**) e de milho (**MAM**); Meio **MA** pH 4,5 com óleo de soja (**MAs**) e milho (**MAm**). Condições experimentais ver 4.2.3 e 4.2.8.

usando um meio **ME** contendo 1% de óleo de oliva e 0,25% de extrato de levedura, mostraram que a produção de lipase foi máxima no início da fase estacionária, o pH inicial variou de 6,2 a 7,8.

O máximo de biomassa foi de 7,0 g (peso seco)/L no início da fase estacionária, após a exaustão da fonte de carbono (óleo de oliva) (**FIGURA 5.6.1**).

O rendimento foi de 0,45 g de células (peso seco)/ g de substrato. A velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foi de 0,45/d, obtido através da relação entre o logaritmo natural dos valores de biomassa na fase exponencial e o tempo de crescimento em dias.

A curva de crescimento não apresentou "fase lag" devido a um inóculo concentrado e a viabilidade das células na fase logarítmica. Os pulsos foram realizados adicionando-se, assepticamente, óleo de oliva ou ácidos graxos ou Tween 80 no 3º e 5º dias de fermentação. Houve um aumento na produção de lipases pelo *P. citrinum* com pulsos menores que 1% (v/v) de óleo de oliva (concentração final) e inibição com concentrações maiores.

Estes resultados não concordam com os obtidos para lipase de leveduras e bactérias que tem sido induzidas com pulsos de 1%(p/v) de óleo de oliva (ISHIHARA e col.,1989; VALERO e col., 1988).

Estudos utilizando simples e multi-pulsos de 1% (v/v) de óleo de oliva, em 0,25 e 0,5% (p/v) de extrato de levedura, mostraram que o aumento de produção de lipases foi proporcional a concentração de extrato de levedura e conseqüentemente à biomassa. Ocorrendo um aumento tanto no rendimento quanto no tempo de produção da lipase.

Nos experimentos usando pulso simples de ácidos oléico, linoléico ou linolênico e Tween 80, na concentração final de 0,04% ou 0,1% (v/v), a produção de lipase foi duas vezes maior que no controle. Mostrando que o

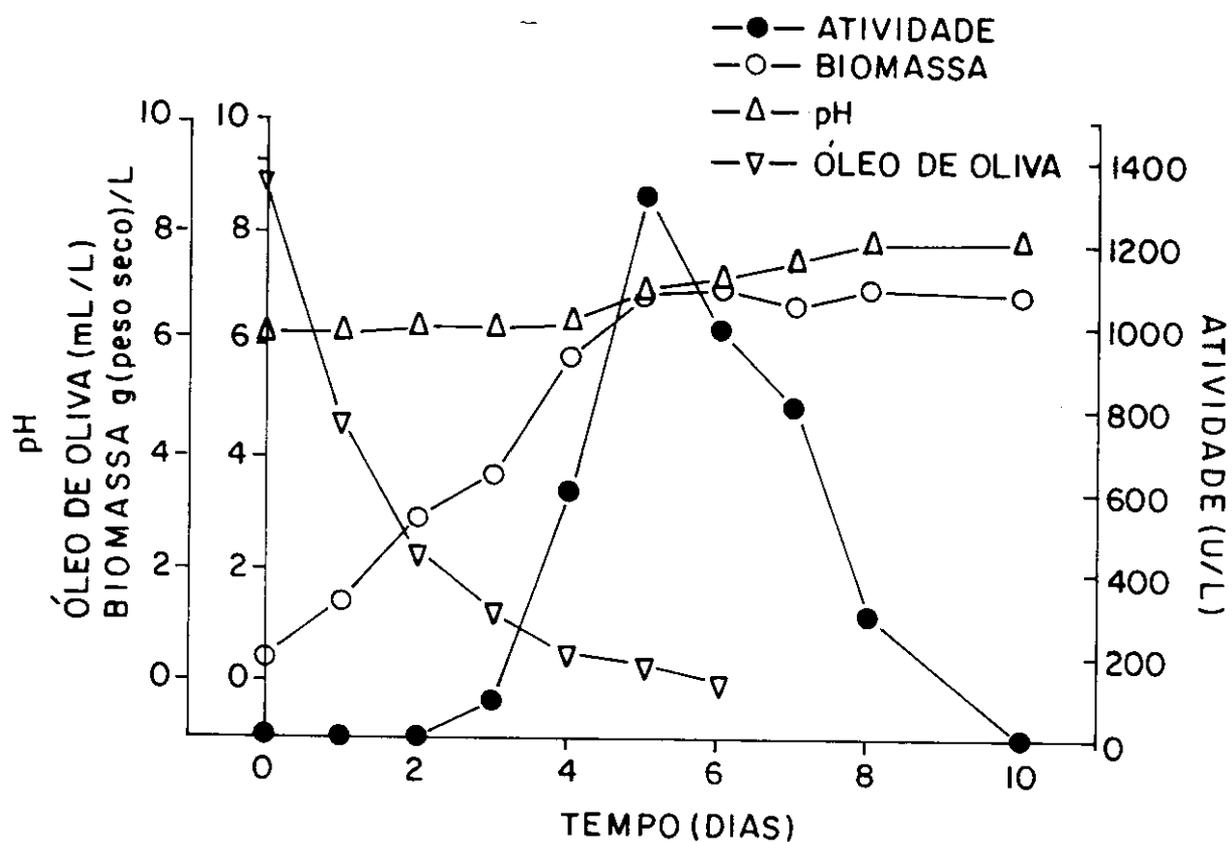


FIGURA 5.6.1 - Produção de lipase e biomassa, variação de pH e consumo de óleo de oliva pelo *Penicillium citrinum*, em Meio **ME**, contendo 0,25% de extrato de levedura e 1% de óleo de oliva.

Biomassa (○-○), atividade lipolítica usando pNPP(●-●), pH (Δ-Δ) e consumo de óleo de oliva (▽-▽).

Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.4; 4.2.6 b.

aumento da produção de lipase não depende da concentração destes indutores (FIGURA 5.6.2 e 5.6.3).

Não houve efeito aparente na produção de lipase pelo *P.citrinum*, para pulsos de 0,04% ou 0,1% de ácido caprílico. Entretanto, utilizando simples pulsos de 0,1% de diferentes indutores, na presença de 1% de óleo de oliva e 0,25% de extrato de levedura, o máximo de produção de lipase pelo *P.citrinum*

(3200 U/L) foi obtido 2 dias após a adição de Tween 80 , ou seja, após 5 dias de fermentação. Resultados similares foram obtidos por MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), com ácido oléico para lipase de *P. citrinum* isolada do solo. Do mesmo modo, Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitano) contendo cerca de 75 % de ácido oléico, causou um aumento na produção de lipase pela *Pseudomonas aeruginosa* (GILBERT e col., 1991).

Entretanto, VALERO e col. (1991), utilizando fermentação em bateladas alimentadas, estudaram a influência de três parâmetros (oxigenação, fonte de nitrogênio e a utilização da mistura D-glucose + óleo de oliva como fontes de carbono) para produção de lipase por *Candida rugosa*. A produção foi proporcional ao crescimento celular, sendo limitada pela deficiência de oxigenação do meio de cultura. A fonte de nitrogênio não afetou a produção de lipase, quando D-glucose e óleo de oliva foram usados juntos, como fonte de carbono. Quando apenas D-glucose foi utilizada como fonte de carbono, a biomassa foi máxima, mas não houve produção significativa de lipase (0,5 U/mL). Esta produção não foi estimulada por pulsos de D-glucose, enquanto que a adição de óleo de oliva, no início da fase estacionária causou um aumento na produção (5 U/mL), mas o extrato enzimático bruto não foi estável ao armazenamento a

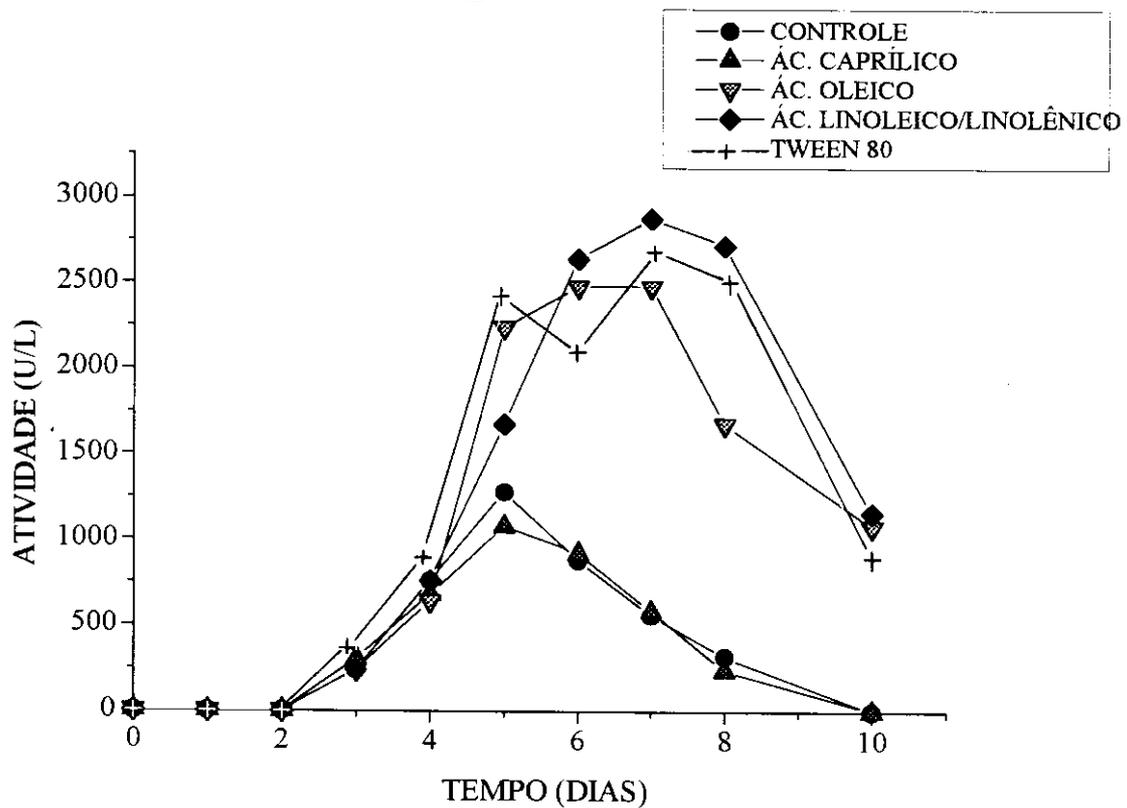


FIGURA 5.6.2 - Produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em fermentação em bateladas alimentadas, Meio **ME**, usando pulsos simples de indutor de 0,04% (concentração final). Pulsos simples de ácidos caprílico (▲-▲), oléico (▼-▼), linoléico/linolênico (◆-◆) ou Tween 80 (+ - +). Controle em Meio **ME** com 025% de extrato de levedura (●-●). Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.4; 4.2.6 b.

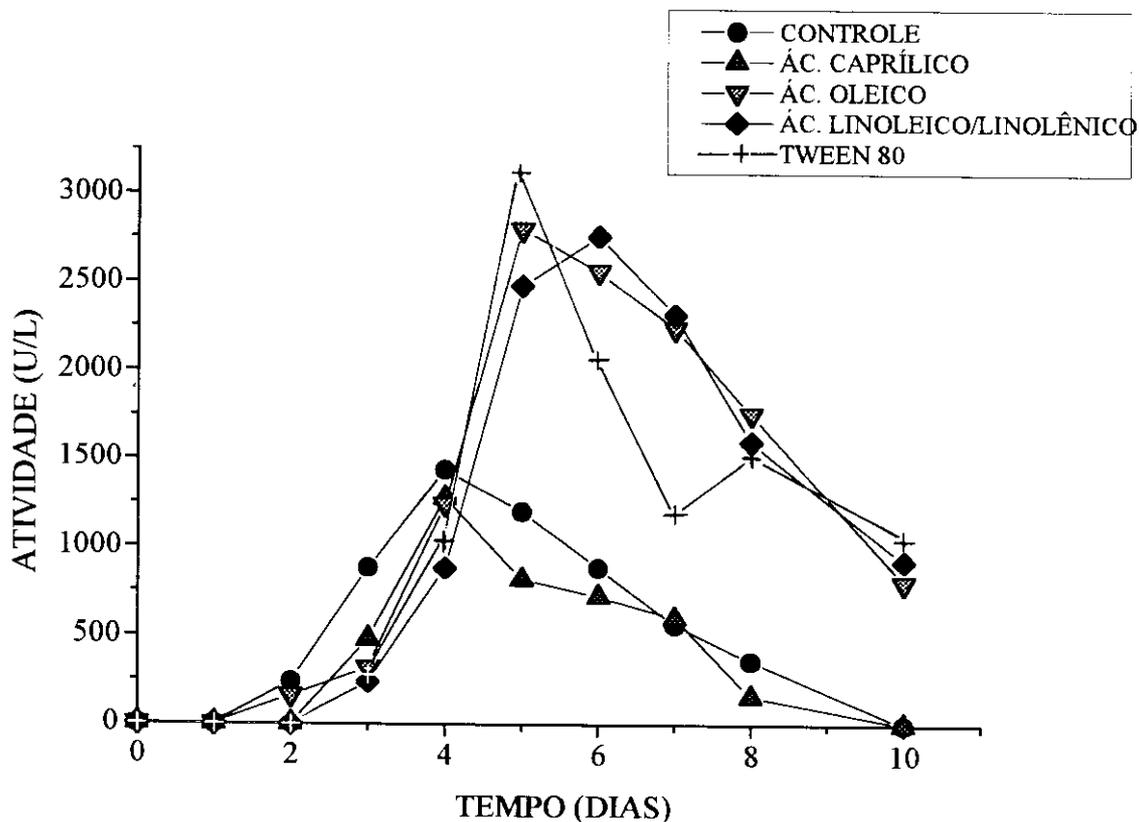


FIGURA 5.6.3 - Produção de lipase pelo *Penicillium citrinum* em fermentação em bateladas alimentadas, Meio ME, usando pulsos simples de indutor de 0,1% (concentração final). Pulsos simples de ácidos caprílico (▲-▲), oléico (▼-▼), linoléico/linolênico (◆-◆) ou Tween 80 (+ - +). Controle em Meio ME com 0,25% de extrato de levedura (●-●). Condições experimentais ver 4.2.1; 4.2.4; 4.2.6 b.

4°C, provavelmente devido a presença de protease. Quando a *Candida rugosa* foi cultivada em meio contendo óleo de oliva como única fonte de carbono, além de apresentar alta atividade lipolítica (5,2 U/mL), aumentou a estabilidade do extrato enzimático bruto, provavelmente devido à menor produção de proteases. Segundo VALERO e col. (1991), estes resultados são importantes para a produção contínua de lipase.

5.7. RECUPERAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DA LIPASE DE *Penicillium citrinum*

a) Produzida em Meio **ME**:

TABELA 5.7 mostra os resultados da recuperação e concentração da lipase produzida no meio **ME**. A adição de sulfato de amônio ao filtrado bruto do meio de cultura, apresentou o máximo de atividade específica na fração de 40-60%, com uma purificação de 11 vezes. Porém, a melhor recuperação de atividade (71,2%) foi obtida na fração de 0-80% de sulfato de amônio. Sendo esta concentração a escolhida para recuperação e concentração da lipase produzida pelo *P.citrinum* em meio **ME**.

Esta recuperação pode ser comparada a obtida com lipase de *Serratia marcescens*, a qual foi recuperada do filtrado bruto do meio de cultura (obtido após 21h de cultivo) pela adição de 35% de sulfato de amônio sólido, com uma recuperação de 64% da atividade lipolítica (MATSUMAE e SHIBATANI, 1994).

b) Produzida em Meio **MA**:

Para a lipase de *P. citrinum* produzida em meio **MA**, a precipitação com sulfato de amônio sólido não apresentou bons resultados em relação à

TABELA 5.7 - Recuperação e concentração da lipase de *Penicillium citrinum* produzida em Meio ME.
Condições experimentais ver 4.2.5 e 4.2.6 b.

Frações	Atividade específica (U/mg Prot.)	Fator de purificação	Recuperação de atividade (%)
Extrato bruto	0,92	1	100
Fracionamento 1			
0 - 20	0,70	0,76	0,30
20 - 40	0,68	0,73	0,29
40 - 60	10,48	11,38	10,30
60 - 80	7,95	8,64	43,15
80 - 100	2,13	2,31	3,50
Fracionamento 2			
0 - 50	6,12	3,60	8,82
0 - 60	4,62	2,70	14,26
0 - 70	7,05	4,14	47,88
0 - 80	7,74	4,50	71,20
0 - 100	4,91	2,88	65,77

recuperação de atividade e proteínas, havendo perda de 90% das proteínas e 60% de atividade específica.

Experimentos para otimização da recuperação da lipase produzida em meio **MA**, levaram a bons resultados utilizando membranas milipore para concentrar o filtrado bruto do meio de cultura (0,54 U/mL). Concentramos o mesmo 5 vezes sem perda de atividade (2,4 U/mL). Posteriormente, o extrato enzimático bruto concentrado poderá ser usado para purificação parcial da enzima ou será liofilizado para aplicação nos sistemas de reação.

5.8. PROPRIEDADES DOS EXTRATOS ENZIMÁTICOS BRUTOS DA LIPASE DE *Penicillium citrinum*

5.8.1. Estabilidade ao armazenamento:

A atividade lipolítica do filtrado bruto do meio de cultura (**ME**) foi estável durante 35 dias a 4°C e instável ao armazenamento a -18°C (**FIGURA 5.8.1.1**). Após concentração com sulfato de amônio (80%), diálise e liofilização a -20°C, resultaram numa preparação estável ao armazenamento a 0°C e à temperatura ambiente foi estável durante um ano. Esta estabilidade sugere que a lipase de *P.citrinum* pode ter aplicação em detergentes e em outros produtos que requerem uma estabilidade ao armazenamento por longo período à temperatura ambiente. Este resultado foi similar ao encontrado para a lipase de *Serratia marcescens* parcialmente purificada que foi estável ao armazenamento -20°C durante 12 meses (MATSUMAE e SHIBATANI, 1994).

Estabilidade ao armazenamento do filtrado bruto do meio **MA** a 6°C, mostrou um tempo de meia-vida de 30 dias, enquanto que esta mesma

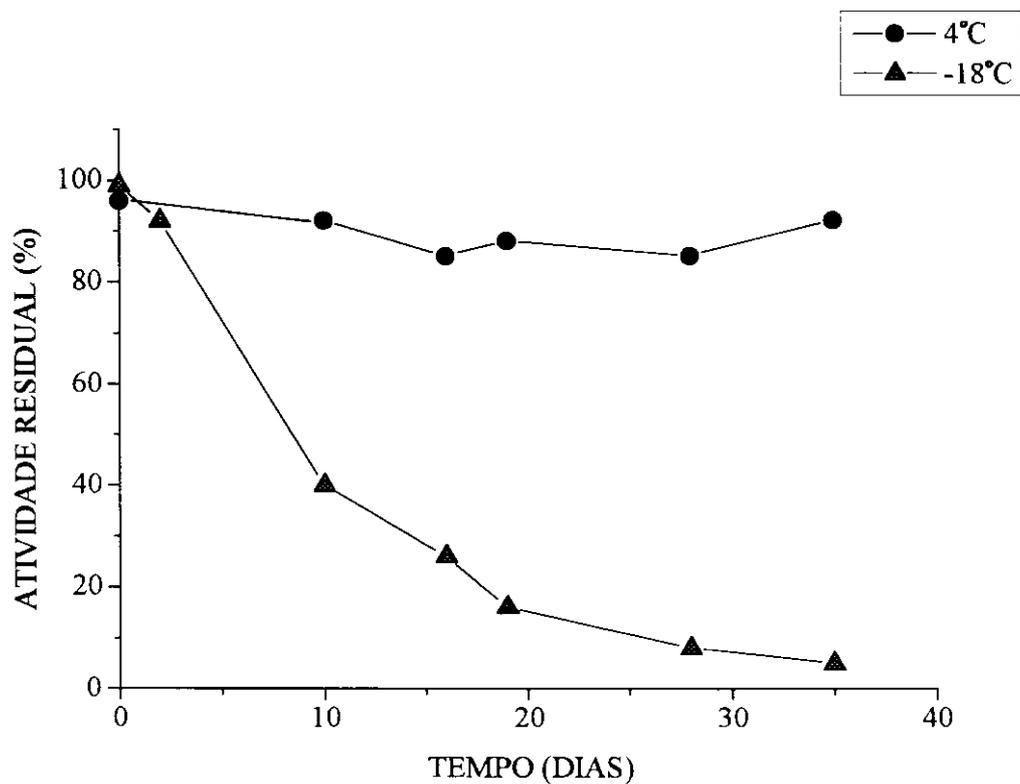


FIGURA 5.8.1.1 - Estabilidade ao armazenamento do filtrado enzimático bruto da lipase produzida pelo *Penicillium citrinum* em meio ME.

Temperatura de armazenamento: 4°C (●-●) e -18°C (▲-▲).

Condições experimentais ver 4.2.5 e 4.2.6 b.

preparação submetida ao armazenamento a -15°C , ao ser descongelada perdeu 50% da atividade inicial.

O congelamento e descongelamento de uma amostra várias vezes, mostrou uma perda de 50% a cada descongelamento, apresentando cerca de 15% da atividade inicial após o quarto descongelamento (**FIGURA 5.8.1.2 e 5.8.1.3**).

5.8.2. Efeito do pH na atividade e Estabilidade da lipase

O efeito de pH na atividade lipolítica foi mostrado na **FIGURA 5.8.2.1**. O pH ótimo para a atividade da lipase produzida no meio **ME** foi 8,0. Enquanto que a lipase produzida em meio **MA** teve um pH ótimo na faixa de 8,0-8,5 (**FIGURA 5.8.2.2**).

Estes resultados não concordam com o encontrado por MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992) para a outra cepa de *P.citrinum* (pH ótimo 7,2). Mas foram similares ao obtido para a lipase de *Rhizopus delemar* (HAAS e col., 1992). De acordo com SAKAGUCHI e col. (1992), a maioria das lipases de fungos têm o pH ótimo para a atividade na faixa de 7,0-9,0 (**TABELA 2.5**, apresentada anteriormente).

A lipase obtida em meio **ME** foi estável na faixa de pH 6,0-7,0, mas o melhor pH para manter a atividade é 6,0. Em valores maiores de pH, houve um decréscimo na atividade das lipase. A pH 8,0, 71% da atividade relativa foi conservada, enquanto que a pH 9,0, a enzima foi completamente inativada, após 1 hora de pré-incubação (**FIGURA 5.8.2.3**). Resultados similares (estável a pH 6,0) foram obtidos para a lipase produzida em meio **MA** (**FIGURA 5.8.2.4**), usando tampão na concentração de 50mM.

Em pH abaixo de 6,0 a atividade da enzima foi afetada pela concentração iônica do tampão fosfato de potássio (50 mM), o qual era

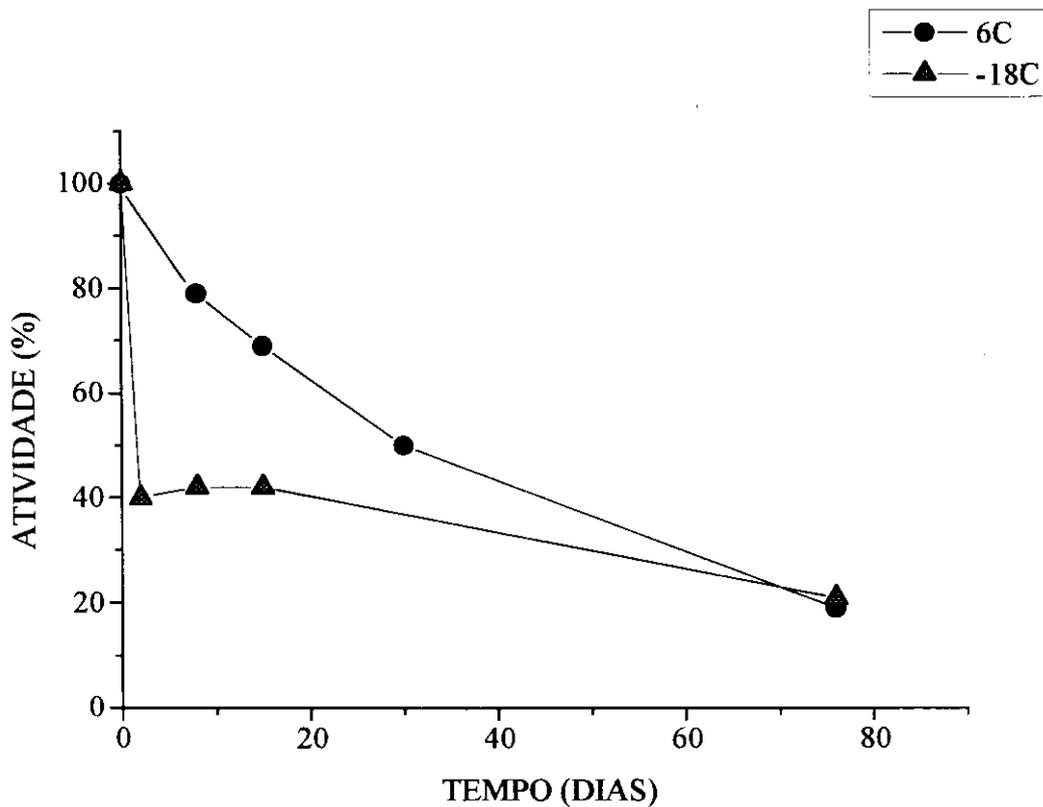


FIGURA 5.8.1.2 - Estabilidade ao armazenamento do filtrado enzimático bruto da lipase produzida pelo *Penicillium citrinum* em meio MA.

Temperatura de armazenamento: 6°C (●-●) e -18°C (▲-▲).

Condições experimentais ver 4.2.5 e 4.2.6 b.

CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO

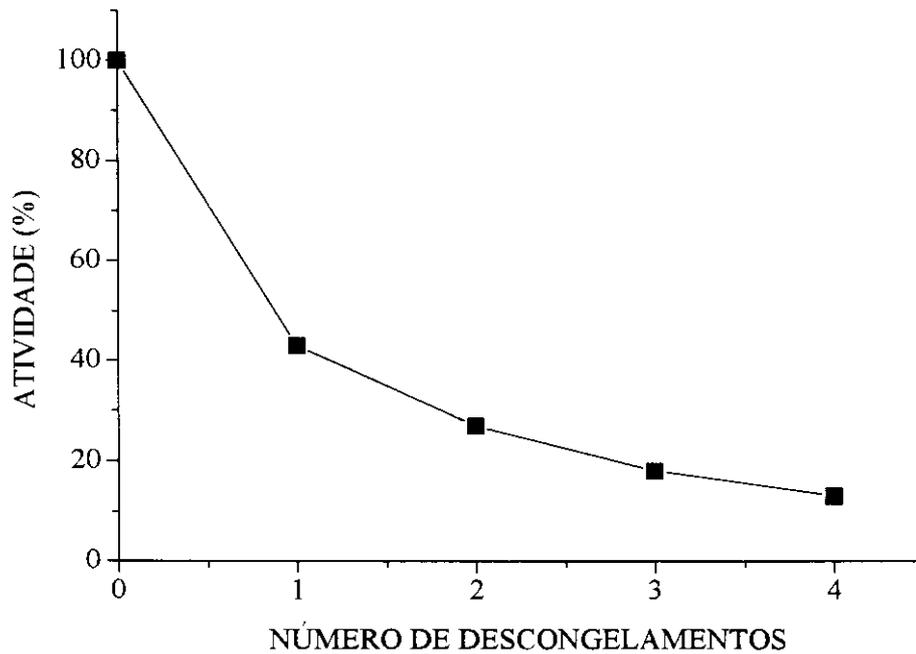


FIGURA 5.8.1.3 - Estabilidade do filtrado enzimático bruto da lipase produzida em Meio MA, pelo *Penicillium citrinum*, ao congelamento e descongelamento. Condições experimentais ver 4.2.5 e 4.2.6 b.

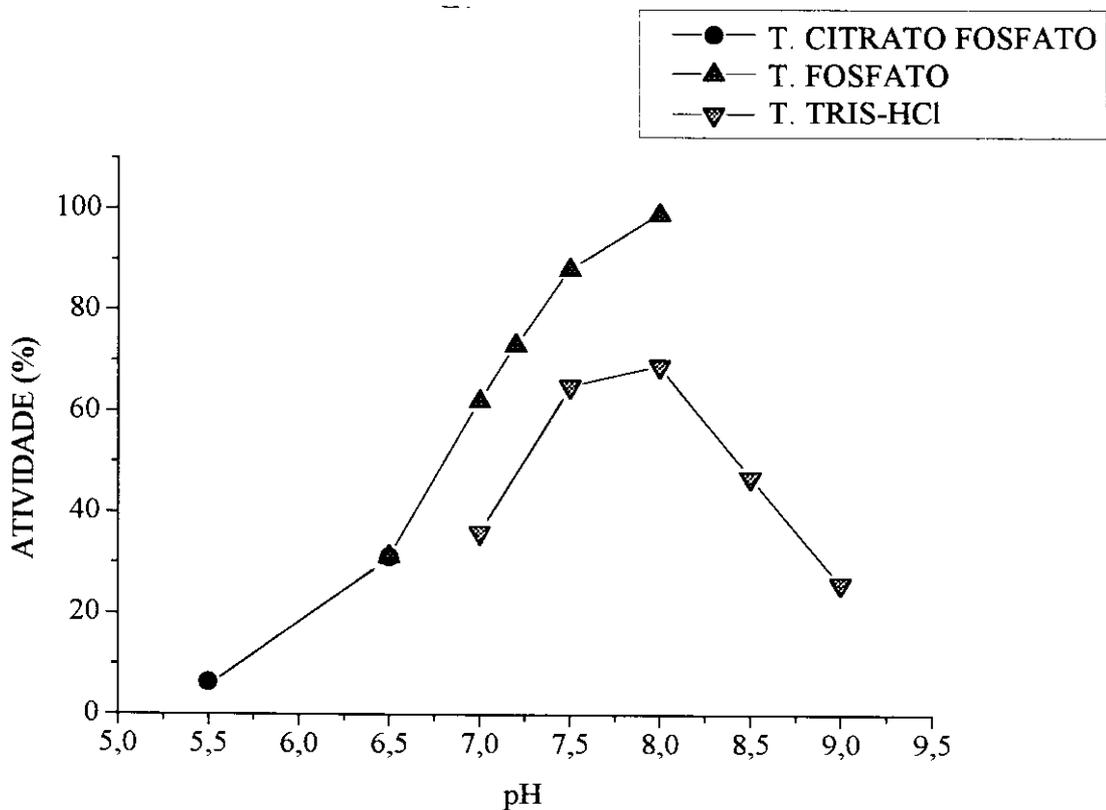


FIGURA 5.8.2.1 - Curva de pH da lipase de *Penicillium citrinum*, produzida em Meio ME.

Atividade lipolítica (Método do pNPP) a 37°C nos seguintes tampões: Citrato - fosfato 0,05 M pH 5,5-6,5 (●-●); Fosfato 0,05 M pH 6,5-8,0 (▲-▲); e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0-9,0 (▼-▼).

Condições experimentais ver 4.2.9 a.

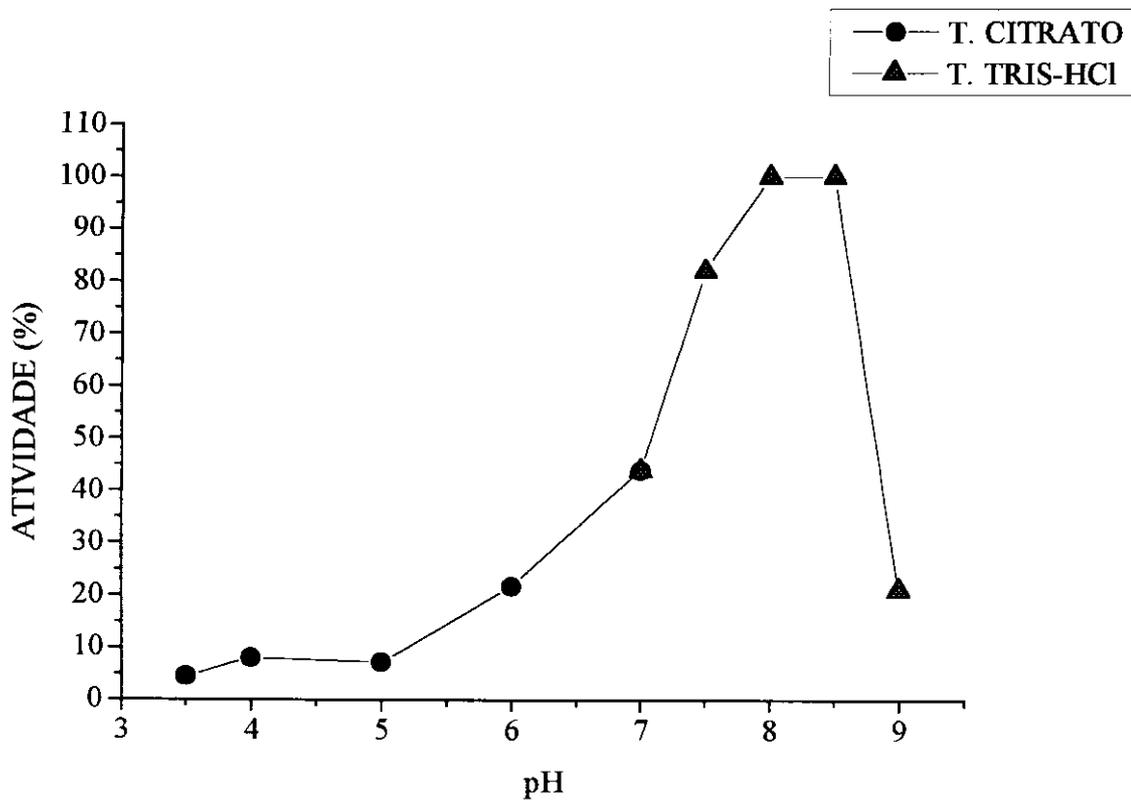


FIGURA 5.8.2.2 - Curva de pH da lipase de *Penicillium citrinum*, produzida em Meio MA.

Atividade lipolítica (Método do pNPP) a 37°C nos seguintes tampões: citrato de sódio 0,05 M pH 3,5 - 7,0 (●-●); e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0-9,0 (▲-▲).

Condições experimentais ver 4.2.9 a.

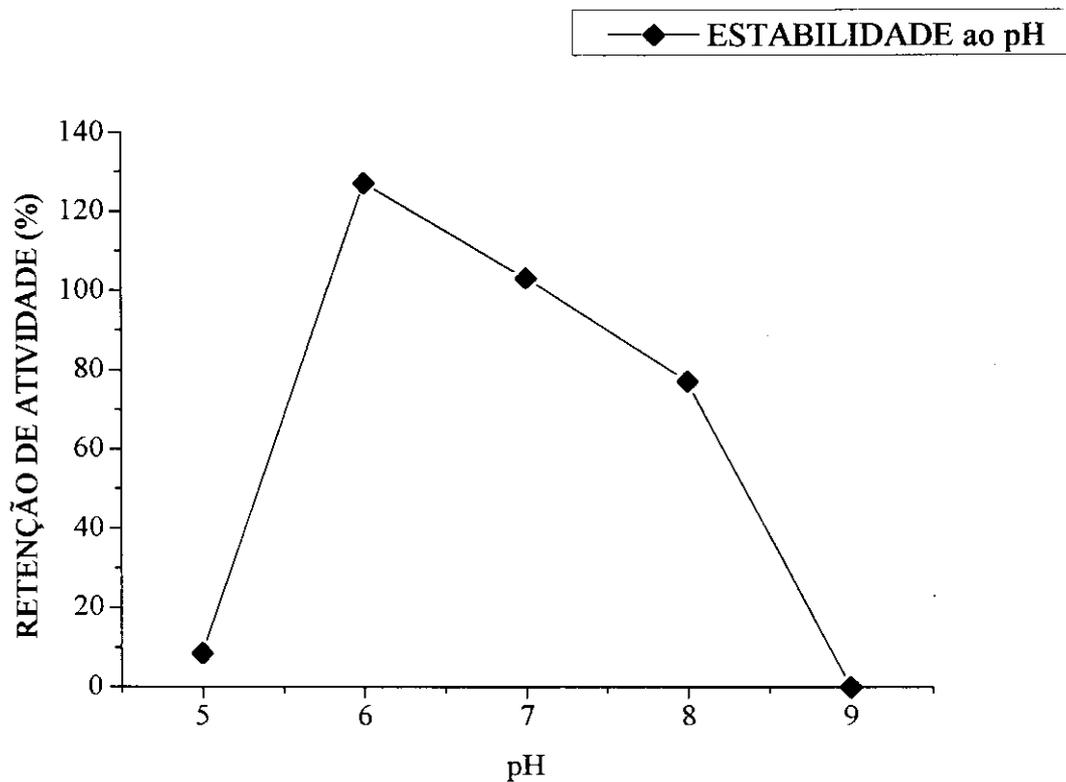


FIGURA 5.8.2.3 - Estabilidade ao pH da lipase de *Penicillium citrinum*, produzida em Meio ME.

Foram utilizados os tampões citrato - fosfato 0,05 M pH 5,0-7,0; fosfato 0,05M pH 7,0-8,0 e Tris-HCl 0,05M pH 8,0-9,0.

Condições experimentais descritas em 4.2.9 a.

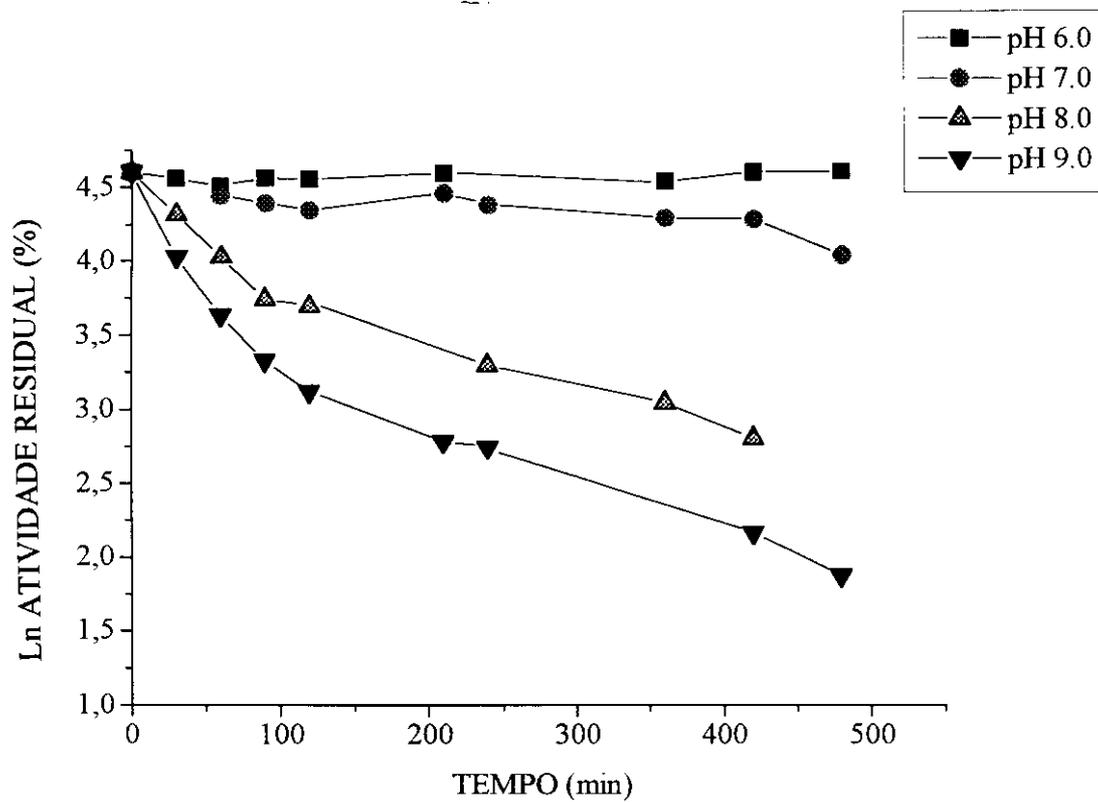


FIGURA 5.8.2.4 - Cinética do efeito de pH sobre a lipase de *Penicillium citrinum* (Meio **MA**). Foram utilizados Tampões acetato de sódio 0,05 M pH 6,0 (■-■) e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 (●-●); 8,0 (▲-▲) e 9,0 (▼-▼). Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL. Condições experimentais ver 4.2.9 a.

50 vezes mais concentrado que a concentração deste sal no meio de cultura. Devido a esta diferença, a lipase produzida em MA a pH 2,6, quando em tampão 50 mM pH 3,5 perdeu 94% da atividade inicial, no entanto a atividade não foi afetada quando o mesmo tampão foi diluído 50 vezes.

A cinética do efeito do pH sobre a atividade lipolítica mostrou um comportamento complexo apresentando uma constante de decaimento para cada parte linear do gráfico, segundo a Teoria de desativação descrita por HENLEY e SADANA (1986). A FIGURA 5.8.2.5 mostra a relação entre as primeiras constantes de decaimento da atividade enzimática ($K_{D1} = 0,00160 \pm 0,00004 \text{ min}^{-1}$ a pH 6,0) e o pH no qual a enzima foi incubada a 28°C.

A meia-vida da lipase ($T_{1/2} = 433,12 \text{ min}$ a pH 6,0) foi inversamente proporcional ao aumento do pH (FIGURA 5.8.2.6). Estes dados são importantes para aplicação biotecnológica desta enzima.

Estes resultados não foram tão bons quanto os obtidos para as lipases I e II de *Trichosporon fermentans* WU-C12, ambas foram estáveis quando incubadas a 30°C por 24h na faixa de pH de 4,0-8,0 (CHEN e col., 1994).

5.8.3. Efeito da temperatura na atividade e Estabilidade da lipase

A temperatura ótima para a atividade lipolítica do *P.citrinum* produzida no meio ME foi encontrado na faixa de 34-37°C. Embora a atividade a 40°C tenha sido 88 % da atividade na temperatura ótima, para fins de aplicação prática da enzima, é possível considerar uma temperatura ótima de 30-40°C. Enquanto que temperatura ótima para lipase em meio MA foi 37°C.

Estes resultados contrastam com o encontrado por MALISZEWSKA

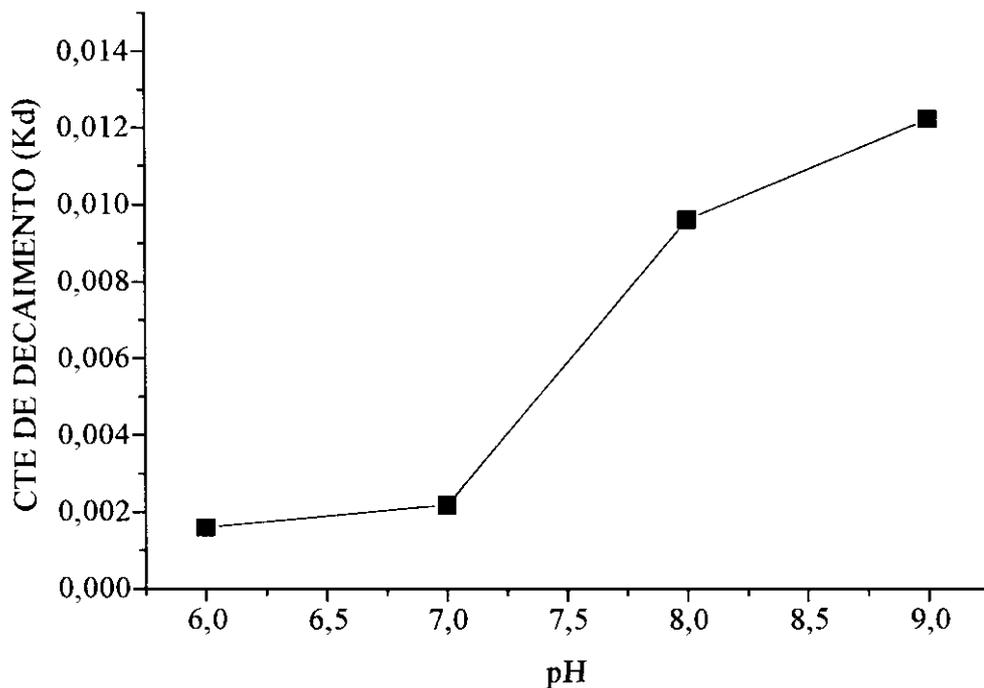


FIGURA 5.8.2.5 - Constantes de decaimento da lipase de *Penicillium citrinum* (Meio MA), em diferentes valores de pH. Foram utilizados Tampões acetato de sódio 0,05 M pH 6,0 e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0 - 9,0. Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL. Condições experimentais ver 4.2.9 a.

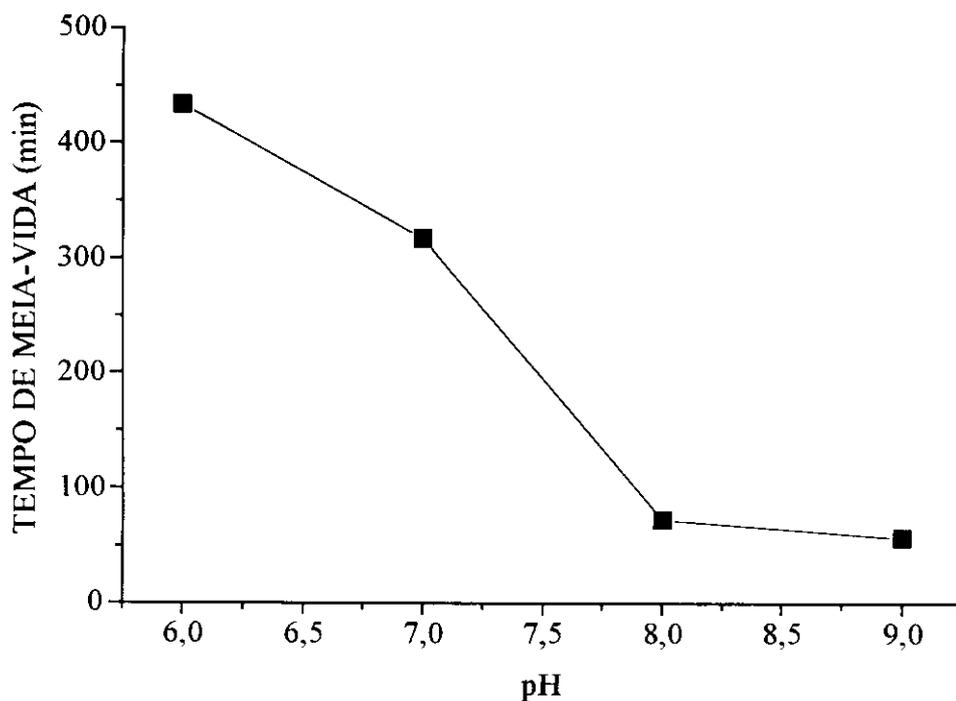


FIGURA 5.8.2.6 - Tempo de meia-vida da lipase de *Penicillium citrinum* (Meio MA), em diferentes valores de pH. Foram utilizados Tampões acetato de sódio 0,05 M pH 6,0 e Tris-HCl 0,05 M pH 7,0-9,0. Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL. $t_{1/2} = 0,693/K_D$. Condições experimentais ver 4.2.9 a.

e MASTALERZ (1992), no qual a temperatura ótima para a lipase de *P. citrinum* do solo foi 30°C.

A atividade lipolítica produzida no meio ME foi mantida por 2 horas, quando incubada em temperaturas abaixo de 40°C e foi totalmente inativada a 60°C após 30 min de incubação.

Segundo MALISZEWSKA e MASTALERZ (1992), a enzima foi ativa a 60°C após 10 min de incubação, estável numa faixa de pH 5,0-7,0 e a pH 9,0 a atividade residual foi 60% da inicial.

O tempo e temperatura de incubação usados em nossos experimentos foram maiores que os usados por outros pesquisadores (1h a 37°C comparado com 10 min a 40°C).

A cinética de desnaturação térmica da lipase do meio MA foi complexa de acordo com a Teoria de HENLEY e SADANA (1986), na qual cada parte linear da curva corresponde a uma constante de decaimento. Grafando as primeiras constantes de decaimento versus temperatura ($K_{D1} = 0,01718 \pm 0,00171$ a 37°C) e os tempos de meia-vida em cada temperatura ($T_{1/2} = 40,34$ min a 37°C), podemos observar que são inversamente proporcionais (FIGURAS 5.8.3.1; 5.8.3.2 e 5.8.3.3). A TABELA 5.8.2 relaciona todos os valores das primeiras constantes de decaimento e tempo de meia-vida da cinética de estabilidade da lipase de *P. citrinum* à diferentes valores de pH e temperatura.

Esta cinética pode ser comparada à desativação térmica da lipase de *Candida rugosa*, a qual mostrou o mesmo comportamento complexo e uma alta sensibilidade à temperatura na parte inicial, nos primeiros 60 min de pré-incubação em temperaturas que variaram de 45-55°C (SOHN e col., 1987).

Candida rugosa produziu lipases com diferentes termoestabilidades

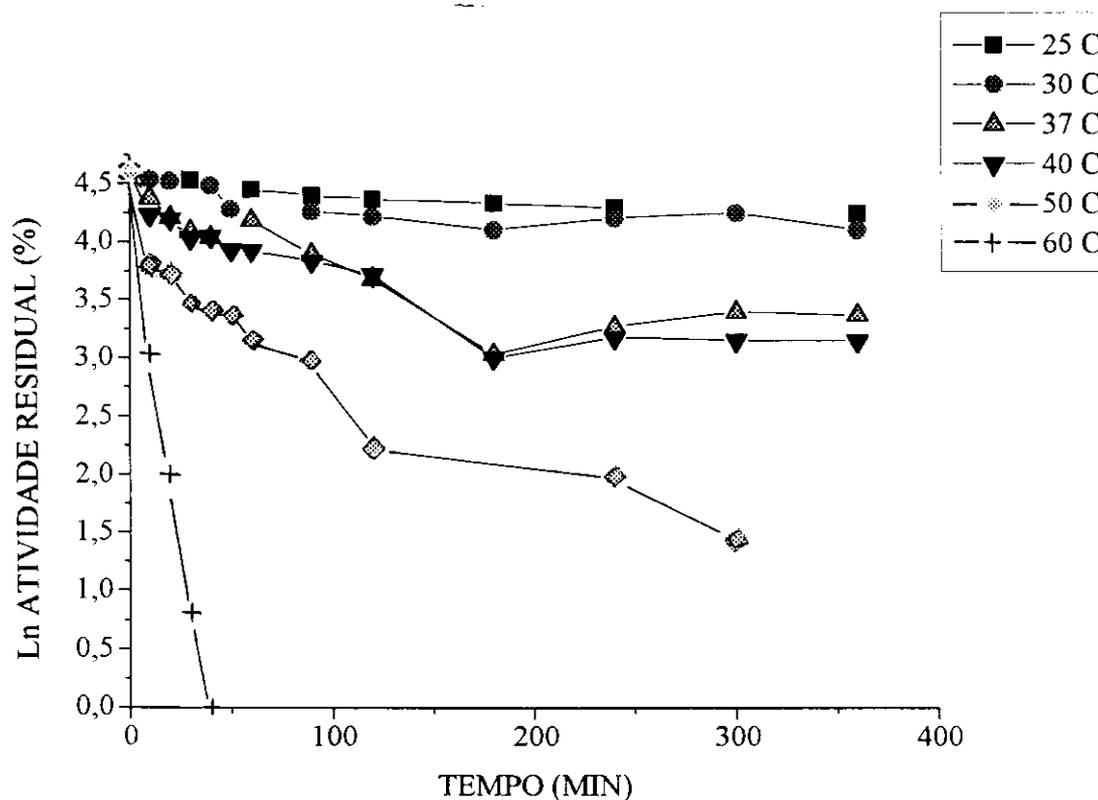


FIGURA 5.8.3.1 - Cinética da estabilidade térmica da lipase de *Penicillium citrinum* (Meio MA).

O filtrado bruto do meio de cultura foi incubado em diferentes temperaturas: 25°C (■-■); 30°C (●-●); 37°C (▲-▲); 40°C (▼-▼); 50°C (◆-◆); 60°C (+ - +). Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL. Condições experimentais ver 4.2.9 b.

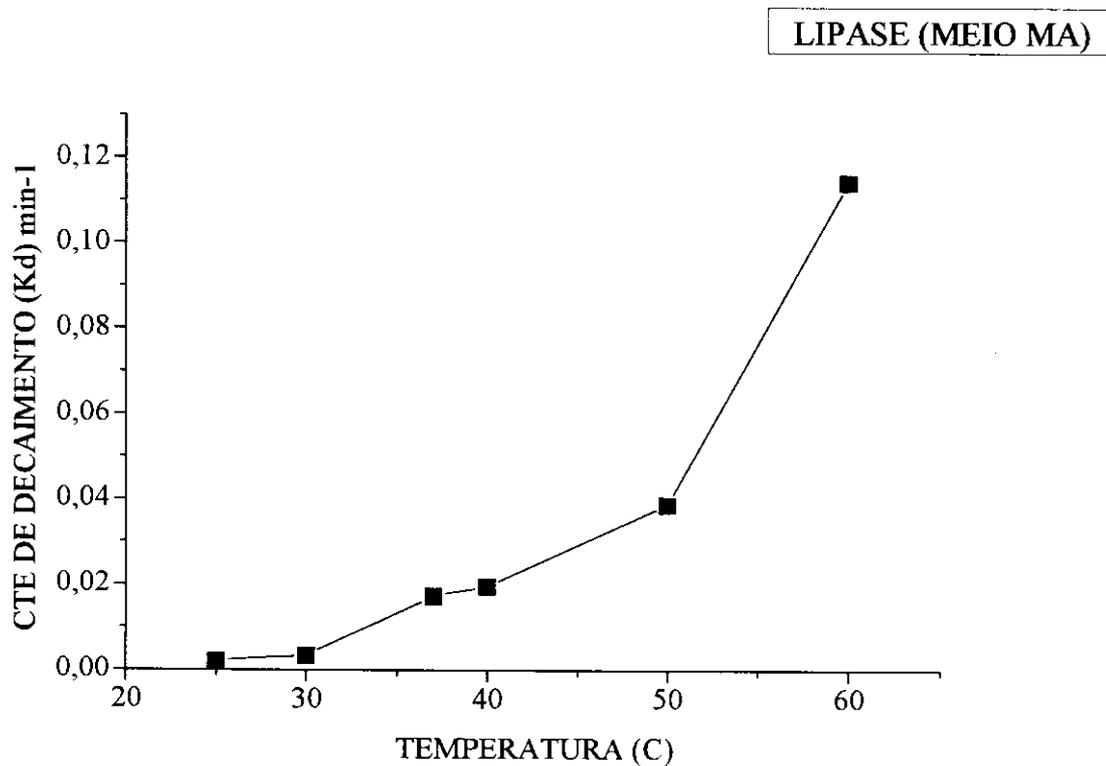


FIGURA 5.8.3.2 - Constantes de decaimento da lipase produzida pelo *Penicillium citrinum* (Meio MA), em diferentes temperaturas.
 Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL.
 Condições experimentais ver 4.2.9 b.

LIPASE (MEIO MA)

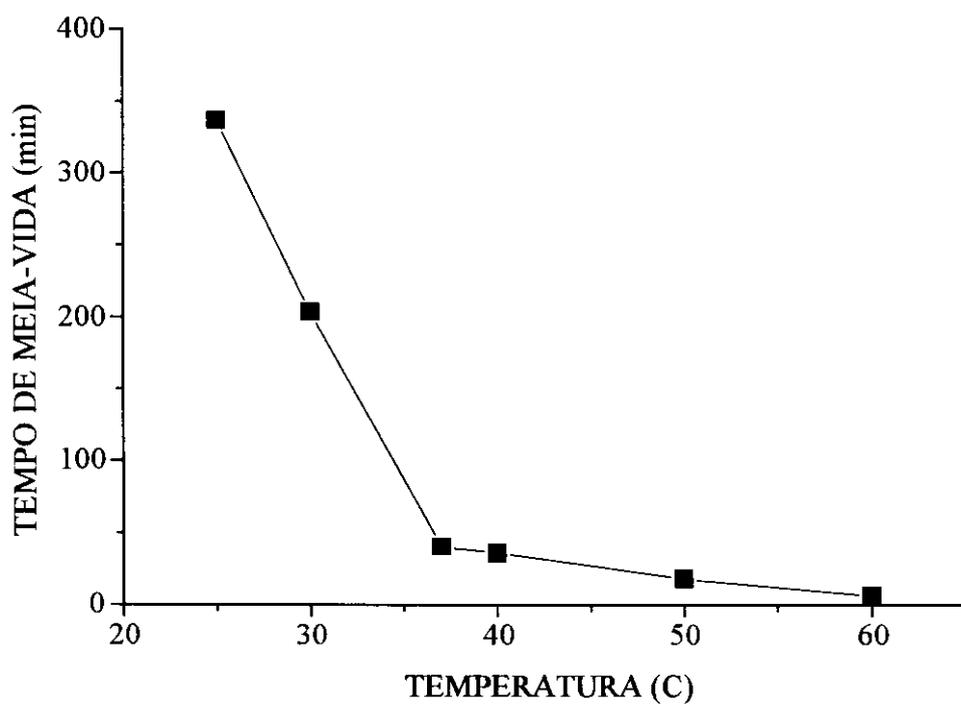


FIGURA 5.8.3.3 - Tempo de meia-vida da lipase produzida pelo *Penicillium citrinum* (Meio MA), em diferentes temperaturas.

Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) de 0,62 U/mL. $t_{1/2} = 0,693/K_D$.

Condições experimentais ver 4.2.9 b.

TABELA 5.8.2 - Constante de decaimento e tempo de meia-vida da lipase de *Penicillium citrinum*, em diferentes valores de pH e temperatura.

Condições experimentais ver 4.2.9a e 4.2.9b

pH	$K_{D1} (\text{min}^{-1}) \times 10^4$	$t_{1/2} (\text{min})^*$
6,0	$16,0 \pm 0,4$	433,12
7,0	$7,9 \pm 1,8$	316,44
8,0	$95,9 \pm 0,3$	72,26
9,0	$122,2 \pm 13,5$	56,80
TEMPERATURA(°C)		
25	$20,6 \pm 2,0$	336,40
30	$34,0 \pm 2,7$	203,82
37	$171,8 \pm 17,1$	40,34
40	$193,8 \pm 9,3$	35,76
50	$385,1 \pm 45,8$	17,99
60	$1141,0 \pm 74,8$	6,07

* $t_{1/2} = 0,693/K_D$

Atividade lipolítica inicial (Método do pNPP) = 0,62 U/mL.

devido suas múltiplas-formas causada pelas condições de cultivo. A lipase B foi a mais estável, apresentando 66% da atividade inicial após 90 min a 55°C em pH 5,0 enquanto que as lipases A e C retiveram apenas 27 e 5%, respectivamente (CHANG e col.,1994).

A lipase de *Serratia marcescens* foi estável a 45°C por 60 min a pH 8,0 e totalmente inativada após 15 min a 100°C (MATSUMAE e SHIBATANI, 1994).

Embora as lipases I e II de *Trichosporon fermentans* WU-C12 tenham apresentado a mesma temperatura ótima (35°C), mostraram diferentes estabilidades térmicas. A lipase I foi estável a 40°C por 30 min e a lipase II a 50°C durante o mesmo tempo de incubação, retendo 70% da atividade inicial a 70°C (CHEN e col., 1994).

As lipases I e II de *Rhizopus niveus* IFO 4759 mostraram o mesmo comportamento, sendo a lipase II mais sensível (reteve 50% da atividade após 30 min a 40°C) que a lipase I (reteve 80% da atividade após 30 min a 40°C). Esta diferença de termoestabilidade foi explicado baseado na porção glicídica ligada à cadeia proteica A da lipase I. Sabe-se que a parte glicídica das glicoproteínas bloqueia a agregação e a desnaturação das proteínas KOHNO e col., 1994).

A energia de ativação da desativação térmica da lipase de *P.citrinum*, calculada de acordo com Arrhenius foi $22,4 \pm 2,2$ Kcal.mol⁻¹ (FIGURA 5.8.3.4).

A energia de ativação da desativação térmica da lipase de *P. citrinum*, a qual é uma glicoproteína, foi na mesma ordem de grandeza que a encontrada por FERRER e col. (1992) para a lignina peroxidase (glicoproteína) de *Chrysonilia sitophila* (11,9 Kcal.mol⁻¹).

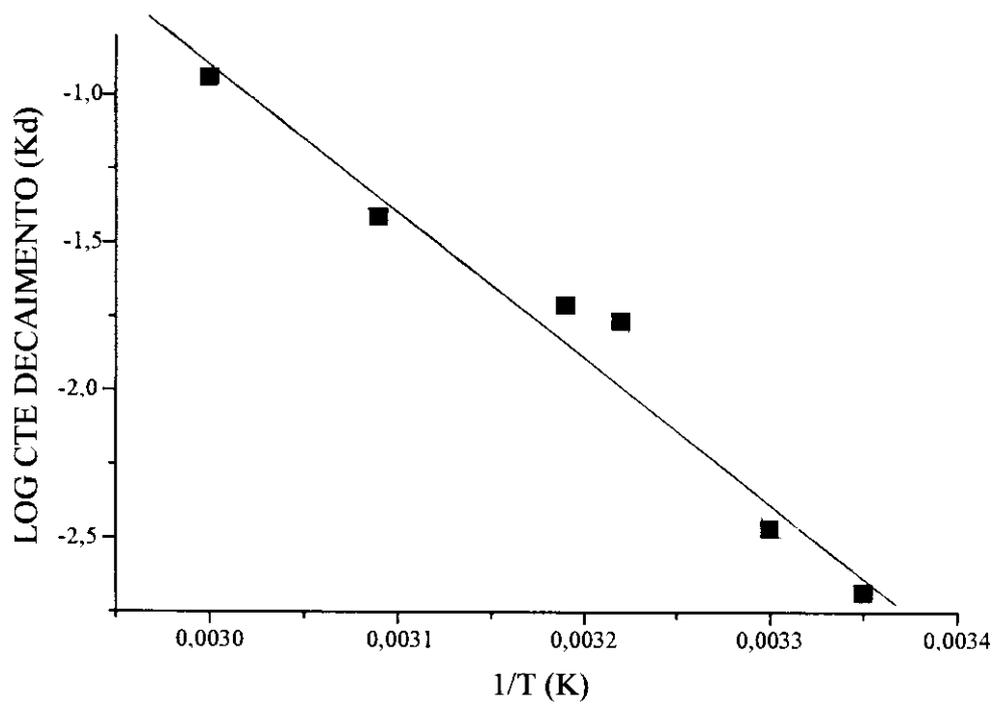


FIGURA 5.8.3.4 - Energia de ativação da desativação térmica da lipase de *Penicillium citrinum* (Meio MA), de acordo com a teoria de Arrhenius.
Condições experimentais 4.2.9 b.

5.8.4. Especificidade da lipase de *Penicillium citrinum*

A lipase de *P.citrinum* em relação a reação de hidrólise de triglicerídios, mostrou-se específica para tricaprilina (C₁₀) (1,37 U/mL) e trioleína (C₁₈) (1,16 U/mL) sendo estas atividades cerca de 2 vezes maior que a obtida usando tributirina (C₄) (0,417 U/mL). Não houve atividade detectável quando o substrato foi a tricaproína (C₆). Estes resultados sugerem que a lipase de *P. citrinum* tem preferência por ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (TABELA 5.8.4).

A lipase de *Serratia marcescens* que hidrolisou preferencialmente os triglicerídios contendo ácidos graxos saturados de cadeia curta (C₈) (MATSUMAE e SHIBATANI, 1994).

Ambas as lipases I e II de *Trichosporon fermentans* WU-C12 hidrolizaram as posições 1, 2 e 3 da trioleína, indicando que são lipases não específicas (CHEN e col., 1994).

5.8.5. Efeito da concentração de substrato

A atividade lipolítica não é governada pela concentração de substrato, mas pela área interfacial após o substrato, como foi proposto por SARDA e DESNUELLE (1958) e BENZONANA e DESNUELLE (1965), usando-se triglicerídios como substratos, porque depende da área interfacial entre a água e óleo.

FIGURA 5.8.5.1 mostra que usando pNPP como substrato, a enzima produzida em meio ME mostrou comportamento Michaelis-Menten, com um K_M aparente de 0,502 ± 0,105 mM. Enquanto que a lipase obtida em meio MA apresentou um K_M aparente de 0,332 ± 0,059 mM para o mesmo substrato nas mesmas condições experimentais.

TABELA 5.8.4 - Especificidade da lipase produzida pelo *Penicillium citrinum* em Meio **MA**, em relação à hidrólise de diferentes triglicerídios.

Condições experimentais ver 4.2.10 e 4.2.6 c.

Substratos (10%)	Atividade (U/mL)
TRIOLEÍNA	1,16
TRIBUTIRINA	0,417
TRICAPRILINA	1,37
TRICAPROÍNA	0

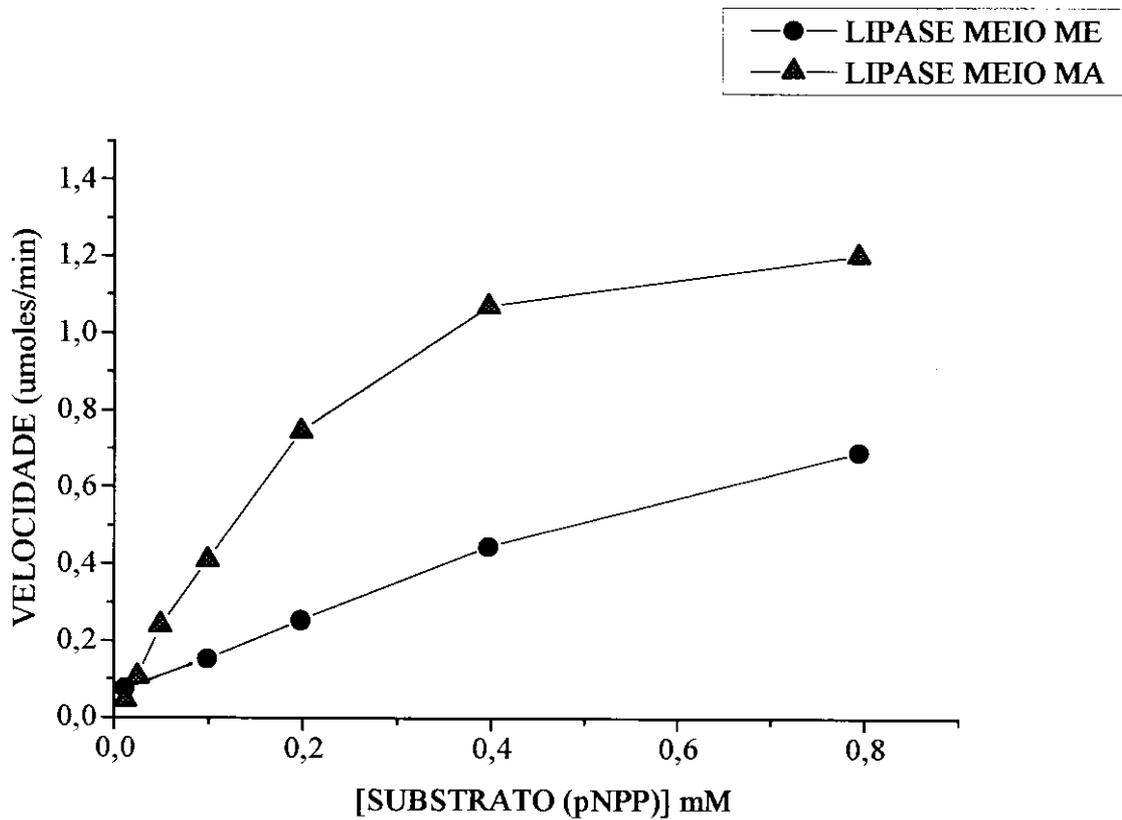


FIGURA 5.8.5.1 - Influência da concentração de substrato (pNPP) sobre a atividade da lipase de *Penicillium citrinum*. Enzima produzida em Meio ME (●-●) e em Meio MA (▲-▲). Condições experimentais ver 4.2.10.

Resultados obtidos pelo método titulométrico não mostra este tipo de comportamento. Foi determinado que em excesso de substrato, para ambos os métodos, a atividade específica foi aproximadamente a mesma (11,0 U/mg proteínas para pNPP e 11,27 U/mg de proteínas para o titulométrico).

Isto sugere que o método pNPP pode ser utilizado para investigar a atividade da lipase de *P. citrinum*. Este método apresenta várias vantagens sobre o titulométrico, como por exemplo, é mais sensível, rápido e apresenta alta reprodutibilidade de resultados.

A lipase de *P. citrinum* em meio MA mostrou maior afinidade por ésteres lipídicos de p-nitrofenil com ácidos graxos de cadeia longa como mostra os resultados do K_M igual a 0,332 mM, 0,787 mM e 1,74 mM para o p-nitrofenilpalmitato (C_{16}), p-nitrofenilmiristato (C_{14}) e p-nitrofenillaurato (C_{12}), respectivamente (**FIGURA 5.8.5.2 e TABELA 5.8.5**).

O K_M da lipase de *P. citrinum* para o pNPL foi 10 vezes maior que o encontrado por REDONDO e col. (1995) para as lipases de *Candida rugosa*. Este resultado sugere que a lipase de *P. citrinum* tem menor afinidade para ésteres lipídicos do p-nitrofenil de ácidos graxos de cadeia curta.

Ambas as lipases A e B são lipases não específicas em relação aos ésteres lipídicos do p-nitrofenil emulsificados com Triton X-100. A lipase A apresentou o máximo de atividade com o p-nitrofenilcaprilato (pNPC) enquanto que a lipase B com o p-nitrofenillaurato (pNPL), mantendo a concentração de Triton X-100 constante. O K_M aparente para pNPL foi 0,12 mM para lipase A e 0,09 mM para lipase B (REDONDO e col., 1995).

5.8.6. Reações de síntese catalisadas pela lipase de *Penicillium citrinum*

A lipase de *P. citrinum* catalisou a síntese de ésteres de glicerol,

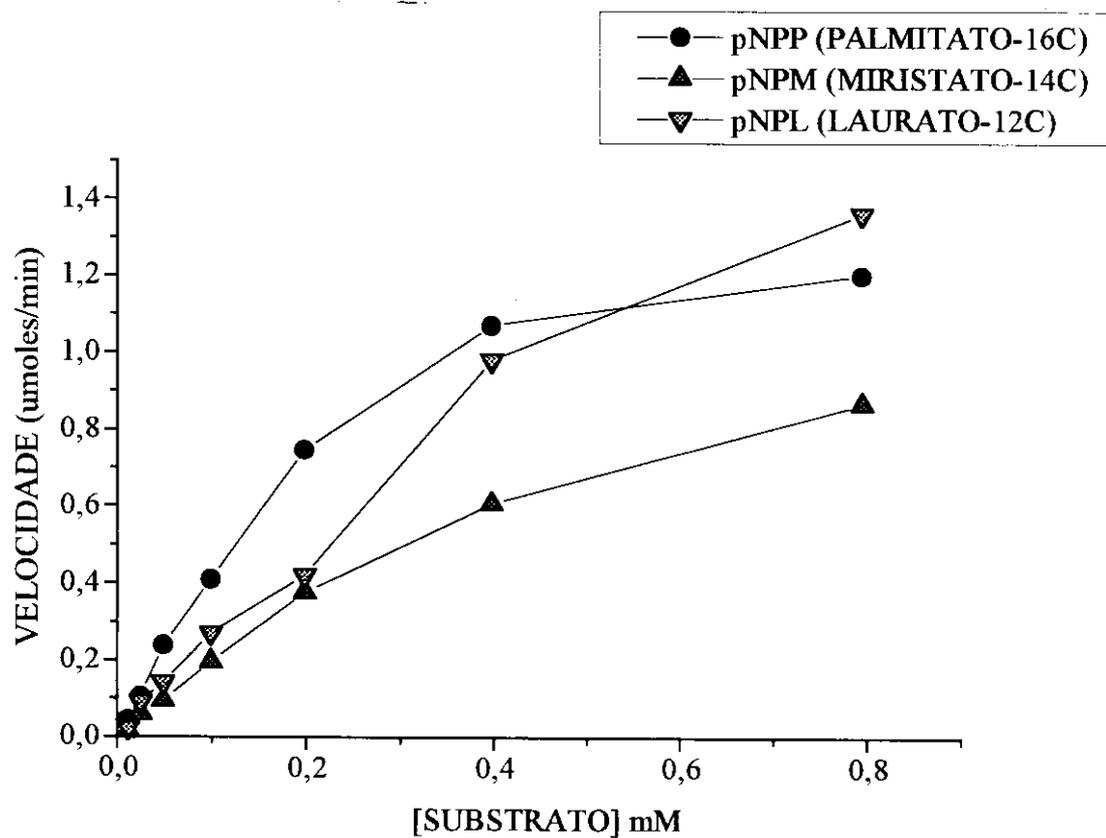


FIGURA 5.8.5.2 - Efeito da concentração de diferentes ésteres lipídicos do p-nitrofenol sobre a lipase de *Penicillium citrinum*, obtida em Meio MA.

pNPP(●-●), pNPM (Δ-Δ) e pNPL (▽-▽).

Condições experimentais ver 4.2.10.

TABELA 5.8.5 - Efeito da concentração de diferentes ésteres lipídicos do p-nitrofenol sobre a atividade da lipase de *Penicillium citrinum*, produzida em meio ME e MA.

Ésteres lipídicos usados: p - nitrofenilpalmitato (**pNPP**); p - nitrofenilmiristato (**pNPM**) e p - nitrofenillaurato (**pNPL**).

Condições experimentais ver 4.2.11 e 4.2.6 b.

LIPASE	pNPP		pNPM		pNPL	
	K _M	V _M	K _M	V _M	K _M	V _M
MEIO ME	0,502 ± 0,105	1,086 ± 0,120	---	---	---	---
MEIO MA	0,332 ± 0,059	1,810 ± 0,180	0,787± 0,001	1,75± 0,001	1,74 ± 0,004	4,46 ± 0,008

*K_M em mM e V_M em μmoles. min⁻¹.

apresentando um consumo de 50% de ácido oléico após 15 horas de incubação a 37°C. Uma TLC da mistura de reação mostrou a formação principalmente de monooleína, sendo evidenciada a presença de di e trioleína após 22 horas de incubação (**FIGURA 5.8.6.1**).

A lipase de *P.citrinūm* não catalisou a síntese de éster de ácido graxo de D-glucose a 45°C, utilizando D-glucose complexada com ácido fenilborônico e ácido láurico. Isto deve ter ocorrido devido a vários fatores, tais como, temperatura de incubação (não foi a temperatura ótima); efeito do solvente sobre a enzima; o tipo de ácido graxo, etc.



AO TO CCS CCI PCS PCI

FIGURA 5.8.6.1 - Cromatografia dos produtos da síntese de ésteres de glicerol catalisada pela lipase de *Penicillium citrinum*. Padrão de ácido oléico (AO) e de trioleína (TO). Produtos das reações catalisadas pelas lipases: *Candida cylindracea* (comercial) solúvel (CCS) e imobilizada (CCI) e de *Penicillium citrinum* solúvel (PCS) e imobilizada (PCI). Condições experimentais 4.2.12.

6. CONCLUSÕES

Penicillium citrinum, isolado como contaminante do óleo de oliva, foi o melhor produtor de lipase (2880 U/L) em meio contendo extrato de levedura (Meio **ME**), como fonte de nitrogênio.

A produção de lipase foi maior (3200 U/L), utilizando Meio **ME** e fermentação em bateladas alimentadas com simples ou múltiplos pulsos de ácidos graxos ou Tween 80 nas concentrações finais de 0,04 ou 0,1%.

O máximo de atividade específica da lipase de *Penicillium citrinum* foi obtida utilizando-se sulfato de amônio, Meio **MA**, (7,8 U/mg de proteínas) em vez de extrato de levedura (4,9 U/mg de proteínas), como fonte de nitrogênio, livre de protease e da micotoxina citrinina.

A melhor fonte de carbono e indutor testada foi o óleo de oliva na concentração de 1%, utilizando ambos os Meios **ME** e **MA**.

A substituição do óleo de oliva pelo subproduto da refinaria de óleo, apresentou bons resultados para a produção de lipase em Meio **MA** (5875 U/L), nas mesmas condições de cultivo utilizadas para o meio **ME**.

A produção de lipase no Meio **MA** foi afetada pela concentração sulfato de amônio e pelo pH inicial do meio.

A produção de lipase em Meio **MA**, contendo 1, 10 ou 30 mM de KH_2PO_4 , no pH inicial de 4,5, foram similares. Ocorrendo uma inibição na

produção em valores acima de 50 mM.

A maior atividade lipolítica específica (Meio **ME**) foi obtida na fração de 40-60% (precipitação com sulfato de amônio), entretanto a melhor recuperação de atividade foi detectada na fração 0-80% (71,2%).

A lipase de *Penicillium citrinum* produzida em Meio **ME**, concentrada e liofilizada, foi estável durante oito meses, ao armazenamento à temperatura ambiente (28-30°C).

O filtrado bruto do Meio **MA** mostrou um tempo de meia vida de 30 dias quando armazenado a 6°C, não sendo estável ao congelamento e descongelamento.

O pH ótimo das enzimas produzidas nos Meios **ME** e **MA** foram, respectivamente, 8,0 e 8,0-8,5.

A lipase produzida no Meio **MA** foi sensível à força iônica.

As temperaturas ótimas das lipases produzidas nos Meios **ME** e **MA** foram, respectivamente, 34-37°C e 37°C.

As lipases produzidas nos Meios **ME** e **MA** foram estáveis a temperatura abaixo de 40°C durante 2 horas e totalmente inativadas a 60°C após 30 minutos.

A lipase do Meio **MA** mostrou uma cinética de desativação térmica

complexa, com uma energia de ativação da desativação térmica de $22,4 \pm 2,2 \text{ Kcal.mol}^{-1}$.

A lipase de *Penicillium citrinum* obtida no Meio **MA**, hidrolisou, preferencialmente, triglicéridios contendo ácidos graxos de cadeia longa, tais como trioleína e tricaprilina.

A lipase de *Penicillium citrinum* produzida em Meio **MA** apresentou K_M diferente da enzima do Meio **ME** para o p-nitrofenilpalmitato (pNPP) ($0,332 \pm 0,059 \text{ mM}$ e $0,502 \pm 0,105 \text{ mM}$, respectivamente). A lipase do Meio **MA** apresentou um K_M de $0,787 \pm 0,001 \text{ mM}$ para o p-nitrofenilmiristato (pNPM) e $1,74 \pm 0,004 \text{ mM}$ para o p-nitrofenillaurato (pNPL).

Ambas as lipases obtidas nos Meios **ME** e **MA** catalisaram a síntese do éster graxo de glicerol com ácido oléico a 37°C . Mas a enzima do Meio **MA** não foi capaz de catalisar a síntese do éster com ácido láurico da D-glucose complexada a 45°C em álcool tert-butilico.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos, a partir da otimização da produção de lipase pelo *Penicillium citrinum*, em sistema de fermentação em batelada, serão utilizados em estudos posteriores para produção desta enzima em larga escala.

A utilização do meio de cultura, contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, para produção de lipase, levará a um processo de recuperação e purificação mais fácil desta enzima, em larga escala, uma vez que, a mesma se encontra livre de contaminantes, tornando o processo economicamente viável.

A alta estabilidade desta lipase ao armazenamento à temperatura ambiente, sugere que a mesma poderá ser utilizada comercialmente como aditivos em detergentes.

A otimização das condições para síntese de ésteres, catalisada por esta lipase, tornará possível uma posterior aplicação na síntese de compostos importantes para indústrias de alimentos, cosméticos, farmacêutica, etc.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKOH, C.C. Enzymatic Synthesis of Acetylated Glucose Fatty Acid Esters in Organic Solvent. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **71**: 319-323, 1994.
- ARBIGE, M.V. and PITCHER, W.H. Industrial Enzymology : A Look Towards the Future. **Trends in Biotechnology**, **7**:330-335, 1989.
- BENZONANA, G. and DESNUELLE, P. Kinetic Study of the Action of Pancreatic Lipase on Triglycerides in Emulsion. Enzymic Action in a Heterogeneous Medium. **Biochimica et Biophysica Acta**, **105**: 121-136, 1965.
- BJÖRKLING, F.; GODTFREDSSEN, E. and KIRK, O. The Future Impact of Industrial Lipases. **Trends in Biotechnology**, **9**:360-363, 1991.
- CHANG, Rey-Chang; CHOU, Shu-Jen and SHAW, Jei-Fu. Multiple Forms and Functions of *Candida rugosa* Lipase. **Biotechnology Applied Biochemistry**, **19**:93-97, 1994.
- CHEN, J.; SHIMURA, S.; KIRIMURA, K. and USAMI, S. Purification of Extracellular Lipases from *Trichosporon fermentans* WU-C12. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **77**:548-550, 1994.
- CHRISTIE, W.N. In: Gas Chromatography and Lipids - **A Practical Guide**. The Only Press - AYR, Scotland, p. 65-74, 1989.
- COX, P.W. and THOMAS, C.R. Classification and Measurement of Fungal Pellets by Automated Image Analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, **39**: 945-952, 1991.
- CRUZ, P.M.; CHRISTEN, P. and FARRÉS, A. Medium Optimization by a Fractional Factorial Design for Lipase Production by *Rhizopus delemar*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **76**:94-97, 1993.

- DAVRANOV, K. D.; KUILIBAEV, I. T.; ROZMUKHAMEDOVA, B. Kh. and MAKHSUMKHANOV, A. A. Physicochemical Properties of Extracellular Lipase from *Rhizopus microsporus* UzLT-3. **Applied Biochemistry and Microbiology**, **31**:346-351, 1995.
- EBIIKE, H. and ACHIWA, K. Lipase-catalyzed Asymmetric Hydrolysis and Regioselective Bromination of 1,4-Dihydropyridine. Synthesis of (R)-(+)-Nilvadipine. **Tetrahedron: Assymetry**, **5**:1447-1450, 1994.
- FABER, K. and FRANSSSEN, M. C. R. Prospects for the Increased Application of Biocatalysts in Organic Transformations. **Trends in Biotechnology**, **11**:461-470, 1993.
- FALCH, E. A. Industrial Enzymes - Developments in Production and Application. **Biotechnology Advanced**, **9**:643-658, 1991.
- FERRER, I.; ESPOSITO, E. and DURÁN, N. Lignin Peroxidase from *Chrysonilia sitophila*: Heat - denaturation Kinetics and pH Stability. **Enzyme and Microbial Technology**, **14**:115-119, 1992.
- FISCHER, K. and MESSNER, K. Adsorption of Lipase on Pulp Fibers During Biological Pitch Control in Paper Industry. **Enzyme and Microbial Technology**, **14**:470-473, 1992.
- FOGLIA, T. A.; PETRUSO, K. and FEAIRHELLER, S. H. Enzymatic Interesterification of Tallow-Sunflower Oil Mixtures. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **70**:281-285, 1993.
- GINTHER, C. I. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **15**:522-526, 1979.
- GUILLOU, C.; MERIEAU, A.; TREBERT, B. and MICHEL, J. F. G. Growth Temperature is Involved in the Regulation of Extracellular Lipase at Two Different Levels in *Pseudomonas fluorescens* Strain MF0.

- Biotechnology Letters**, 17:377-382, 1995.
- HAAS, M. J.; CICHOWICZ, D.J. and BAILEY, D. G. Purification and Characterization of an Extracellular Lipase from Fungus *Rhizopus delemar*. **Lipids**, 27:571-576, 1992.
- HENLEY, J.P. and SADANA, A. Deactivation Theory. **Biotechnology and Bioengineering**, 28:1277-1285, 1986.
- HENRIETTE, C.; ZINEBI, S.; AUMAITRE, M.F.; PETITDEMANGE, E. and PETITDEMANGE, H. Protease and Lipase Production by a Strain of *Serratia marcescens* (532 S). **Journal of Industrial Microbiology**, 12:129-135, 1993.
- HOSHINO, T.; SASAKI, T.; WATANABE, Y.; NAGASAWA, T. and YAMANA, T. Purification and Some Characteristics of Extracellular Lipase from *Fusarium oxysporum f. sp. lini*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 56:660-664, 1992.
- HOSOBUCHI, M.; OGAWA, K. and YOSHIKAWA, H. Morphology Study in Production of ML-236 B, a Precursor of Pravastatin Sodium, by *Penicillium citrinum*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 76: 470-475, 1993.
- HOU, C.T. pH Dependence and Thermostability of Lipases from Cultures from the ARS Culture Collection. **Journal of Industrial Microbiology**, 13: 242-248, 1994.
- IKEDA, I. and KLIBANOV, A.M. Lipase-Catalysed Acylation of Sugars Solubilized in Hydrophobic Solvents by Complexation. **Biotechnology and Bioengineering**, 42:788-791, 1993.
- ISHIHARA, K.; SUZUKI, T.; YAMANE, T. and SHIMIZU, S. Effective Production of *Pseudomonas fluorescens* Lipase by Semi-Batch Culture with Turbidity-Dependent Automatic Feeding of Both Olive Oil and

- Iron Ion. **Applied Microbiology Biotechnology**, **31**:45-48, 1989.
- GILBERT, E.J.; DROZD, J.W. and JONES, C.W. Physiological Regulation and Optimization of Lipase Activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. **Journal of General Microbiology**, **137**:2215-2221, 1991.
- JANSSEN, G.G. and HAAS, M.J. Lipase-Catalyzed Synthesis of Oleic Acid Esters of Polyethylene Glycol 400. **Biotechnology Letters**, **16**:163-168 1994.
- KAIMAL, T.N.B.; PRASAD, R. B. N. and CHANDRASEKHARA RAO, T. A Novel Lipase Hydrolysis Method to Concentrate Erucic Acid Glycerides in *Cruciferae* Oils. **Biotechnology Letters**, **15**:353-356, 1993.
- KIESLICH, K. Aspects for the Future of Biotransformations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **8**:67-71, 1992.
- KLEINER, K. Altered Crop Threatens Poor Nations. **New Scientist**, 17 June, p. 10, 1995.
- KLOOSTERMAN, M.; ELFERINK, V.H.M.; LERSEL, J.V.; ROSKAM, J.H.; MEIJER, E.M.; HULSHOF, L.A. and SHELDON, R.A. Lipases in the Preparation of β -Blockers. **Trends in Biotechnology**, **6**:251-256, 1988.
- KOHNO, M.; KUGIMIYA, W.; HASHIMOTO, Y. and MORITA, Y. Purification, Characterization and Crystallization of Two Types of Lipase from *Rhizopus niveus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, **58**:1007-1012, 1994.
- KRISTIANSEN, B. and OLSVIK, E.S. Rheology of Filamentous Fermentation Broths. In: Extended Summaries Biotechnology Group Meeting Recent Developments in Fungal Bioprocessing. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, **56**:203-222, 1993.
- KUHAD, R.C. and SINGH, A. Enhanced Production of Cellulases by *Penicillium citrinum* Solid State Fermentation of Cellulosic Residue.

- World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **9**:100-101, 1993.
- KWON, D.Y. and RHEE, J.S. A Simple and Rapid Colorimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **63**:89-92, 1986.
- LEJEUNE, R.; NIELSEN, J. and BARON, G.V. Influence of pH on the Morphology of *Trichoderma reesei* QM 9414 in Submerged Culture. **Biotechnology Letters**, **17**:341-344, 1995.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, **193**:265-275, 1951.
- MACRAE, A.R. Lipase-Catalyzed Interesterification of Oils and Fats. **Journal of the American Oil Chemists Society**, **60**:291-294, 1983.
- MALISZEWSKA, I. and MASTALERZ, P. Production and some Properties of Lipase from *Penicillium citrinum*. **Enzyme and Microbial Technology**, **14**:190-193, 1992.
- MARGOLIN, A.L. Enzymes in the Synthesis of Chiral Drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, **15**:266-280, 1993.
- MATSUMAE, H. and SHIBATANI, T. Purification and Characterization of the Lipase from *Serratia marcescens* Sr41 8000 Responsible for Asymmetric Hydrolysis of 3-Phenylglycidic Acid Esters. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **77**:152-158, 1994.
- MIKHAILOVA, R.V.; SAPUNOVA, L.I. and LOBANOK, A.G. Biosynthesis of Pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **10**:457-461, 1994.
- MIZUGUCHI, E.; ACHIWA, K.; WAKAMATSU, H. and TERAOKA, Y. Lipase-Catalyzed Resolution of 5,5 - Disubstituted Hydantoins. **Tetrahedron:Asymmetry**, **5**:1407-1410, 1994.

- MUKESH, D.; SHETH, D.; MOKASHI, A.; WAGH, J.; TILAK, J.M.; BANERJI, A.A. and THAKKAR, K.R. Lipase Catalysed Esterification of Isosorbide and Sorbitol. **Biotechnology Letters**, **15**:1243-1246, 1993.
- NIELSEN, J. and KRABBEN, P. Hyphal Growth and Fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in Submerged Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, **46**:588-598, 1995.
- NOTHENBERG, M. Enzimas Retornam aos Detergentes. **Química e Derivados**, **283**: 8-13, 1991.
- OBRADORS, N.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J. and SOLÀ, C. Effects of Different Fatty Acids in Lipase Production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, **15**:357-360, 1993.
- OHNISHI, K.; YOSHIDA, Y. and SEKIGUCHI, J. Lipase Production of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **77**: 490-495, 1994.
- OKEKE, C.N. and OKOLO, B.N. The Effect of Cultural Condition of Lipase by *Acremonium strictum*. **Biotechnology Letters**, **12**:747-750, 1990.
- PARK, Y.K. and PASTORE, G.M. Esterificação de Ácido Graxo com Glicerol por Lipases Microbianas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, **9**:163-171, 1989.
- PAUL, G.C.; KENT, C. A. and THOMAS, C. R. Hyphal Vacuolation and Fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. **Biotechnology and Bioengineering**, **44**:655-660, 1994.
- PIMENTEL, M.C.B.; KRIEGER, N.; COELHO, L.C.C.B.; FONTANA, J.D.; MELO, E.H.M.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L. Lipase from a Brazilian strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **49**:59-74, 1994.
- POKORNY, D.; FRIEDRICH, J. and CIMERMAN, A. Effect of Nutritional

- Factors on Lipase Biosynthesis by *Aspergillus niger*. **Biotechnology Letters**, **16**:363-366, 1994.
- PUERTAS, S.; BRIEVA, R.; REBOLLEDO, F. and GOTOR, V. Lipase Catalyzed Aminolysis of Ethyl Propiolate and Acrylic Esters. Synthesis of Chiral Acrylamides. **Tetrahedron**, **49**:4007-4014, 1993.
- RAPP, P. and BACKHAUS, S. Formation of Extracellular Lipases by Filamentous Fungi, Yeast, and Bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, **14**:938-943, 1992.
- RATLEDGE, C. Biodegradation and Biotransformations of Oils and Fat - Introduction. In: Mini-Review Compilation Biodegradation and Biotransformations of Oils and Fats. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**, **55**:397-414, 1992.
- RAZAFINDRALAMBO, H.; BLEKER, C.; LOGNAY, G.; MARLIER, M. WATHELET, P. and SEVERIN, M. Improvement of Enzymatic Synthesis Yield of Flavour Acetate: The Example of the Isoamyl Acetate. **Biotechnology Letters**, **16**: 247-250, 1994.
- REDONDO, O.; HERRERO, A.; BELLO, J.F.; ROIG, M.G.; CALVO, M.V. PLOU, F.J. and BURGUILLO, F.J. Comparative Kinetic Study of Lipases A and B from *Candida rugosa* in the Hydrolysis of Lipid p-Nitrophenyl Esters in Mixed Micelles with Triton X-100. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1243**:15-24, 1995.
- SAKAGUCHI, K.; TAKAGI, M.; HORIUCHI, H. and GOMI, K. Fungal Enzymes Used in Oriental Food and Beverage Industries. In: **Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi**, Kinghorn, J.R. and Turner, G. eds. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK, p.75-81, 1992.
- SARDA, L. and DESNUELLE, P. Action of Pancreatic Lipase on Emulsified Esters. **Biochimica et Biophysica Acta**, **30**:513-521, 1958.

- SANTANIELLO, E.; FERRABOSCHI, P. and GRISENTI, P. Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic Solvents: Applications to the Preparation of Enantiomerically Pure Compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, **15**:367-382, 1993.
- SCOTT, P. M.; LAWRENCE, J. W. and WALBEEK, W. Detection of Mycotoxin by Thin - Layer Chromatography: Application to Screening Fungal Extracts. **Applied Microbiology**, **20**:839-842, 1970.
- SHARMA, A. and CHATTOPADHYAY, S. Lipase Catalysed Acetylation of Carbohydrates. **Biotechnology Letters**, **15**:1145-1146, 1993.
- SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NAGAO, T. and TOMINAGA, Y. Induction of *Geotrichum candidum* Lipase by Long-Chain Fatty Acids. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **74**:77-80, 1992.
- SOHN, H.S.; CHUNG, S.S. and RHEE, J.S. Deactivation of *Candida rugosa* Lipase. **Biotechnology Letters**, **9**:117-122, 1987.
- STAMATIS, H.; XENAKIS, A.; PROVELEGIU, M. and KOLISIS, F.N. Esterification Reactions Catalyzed by Lipases in Microemulsions: The Role of Enzyme Localization in Relation to Its Selectivity. **Biotechnology and Bioengineering**, **42**:103-110, 1993.
- STUER, W.; JAEGER, K.E. and WINKLER, U.K. Purification of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, **168**:1070-1074, 1986.
- SZTAJER, H. and MALISZEWSKA, I. Production of Exogenous Lipases by Bacteria, Fungi, and Actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, **10**:492-497, 1988.
- SZTAJER, H. and MALISZEWSKA, I. The Effect of Culture Conditions on Lipolytic Productivity of *Penicillium citrinum*. **Biotechnology Letters**, **11**:895- 898, 1989.

- TILBEURGH, H.V.; EGLOFF, M-P.; MARTINEZ, C.; RUGANI, N.; VERGER, R. and CABBILLAU, C. Interfacial Activation of the Lipase Procolipase Complex by Mixed Micelles Revealed by X-Ray Crystallography. **Nature**, **362**: 814-820, 1993.
- VALERO, F.; AYATS, F.; LÓPEZ-SANTINI, J. and POCH, M. Lipase Production by *Candida rugosa*: Fermentation Behaviour. **Biotechnology Letters**, **10**:741-744, 1988.
- VALERO, F.; RÍO, J.L.; POCH, M. and SOLÀ, C. Fermentation Behaviour of Lipase Production by *Candida rugosa* Growing on Different Mixtures of Glucose and Olive Oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **72**:399-401, 1991.
- VINÀS, I.; DADON, J. and SANCHIS, V. Citrinin-Producing Capacity of *Penicillium expansum* Strains from Apple Packinghouses of Lerida (Spain) **International Journal of Food Microbiology**, **19**:153-156, 1993.
- VORDERWÜLBECKE, T.; KIESLICH, K. and ERDMANN, H. Comparison of Lipases by Different Assays. **Enzyme Microbiology and Technology**, **14**: 631-654, 1992.
- VULFSON, E.N. Enzymatic Synthesis of Food Ingredients in Low-Water Media. **Trends in Food Science & Technology**, **4**:209-215, 1993.
- WINKLER, U.K. and STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, **138**:663-670, 1979.
- WOO, J.; ONO, H. and TSUJI, T. Cathostatins, New Cysteine Protease Inhibitors Produced by *Penicillium citrinum*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, **59**:350-352, 1995.
- YAMAZAKI, M.; ITOKAWA, H. and KINOSHITA, H. Fungal Flora in Herbal Drugs from India, with Particular Reference to Mycotoxin

Producibility. **Microbiology Abstracts**, 24: 35, 1980.

ZHOU,Q-H. and KOSARIC, N. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida bombicola*. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 72:67-71, 1995.

9. PUBLICAÇÕES ORIGINADAS DESTA TESE

a) Revistas Internacionais:

Pimentel, M.C.B. ; Krieger, N.; Coelho., L. C. C. B.; Fontana, J. D.; Melo, E.H.M.; Ledingham, W. M.; Lima Filho, J. L. Lipase From a Brazilian Strain of *Penicillium citrinum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 49:59-74,1994.

Pimentel, M.C.B.; Melo, E. H. M.; Lima Filho, J.L.; Durán, N. Production of Lipase Free of Citrinin in *Penicillium citrinum*.**Mycopathologia**,1995. **In press**.

Pimentel,M.C.B.;Melo,E.H.M.;Lima Filho,J.L.; Ledingham,W.M.; Durán,N. Brazilian Strain *Penicillium citrinum* Lipase: Heat-Denaturation and pH Stability Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1995. Enviado para publicação.

b) Comunicações em Congressos:

Pimentel,M.C.B.;Chiu,W.S.;Nadruz Jr,W.;Lima Filho,J.L.Synthetic Activity of Soluble and Immobilized *Penicillium citrinum* lipase. **XXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, Caxambu, MG,14-17 de maio de 1994.

Pimentel,M.C.B.; Durán,N.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L. Efeito da Fonte de Carbono na Produção de Lipase pelo *Penicillium citrinum*.**X Reunião Anual da FESBE**, Caxambu, MG, 26-30 de agosto, 1994.

- Pimentel, M.C.B.; Durán, N.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L. Produção de Citrinina pelo *Penicillium citrinum*. **X Reunião Anual da FESBE**, Caxambu, MG, 26-30 de agosto, 1994.
- Pimentel, M.C.B.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L.; Durán, N. Citrinin:Lipase Production Free of Mycotoxin in *Penicillium citrinum*. **I Congresso Latino Americano de Micotoxicologia / VIII Encontro Nacional de Micotoxinas**, Rio de Janeiro, 26-30 de setembro, 1994.
- Dewark, K.D.; Brett, D.A.; Salgueiro, A.A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J.L.; Melo, E.H.M.; Durán, N. Lipase Production by *Penicillium citrinum* Using Fed-Batch Experiments by Single Pulse Technique. **7th European Congress on Biotechnology**, Nice, França, 19-23 de fevereiro, 1995.
- Pimentel, M.C.B.; Lendingham, W.M.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L.; Durán, N. Effect of Ammonium Sulfate as Nitrogen Source and pH Lipase Production by *Penicillium citrinum*. **XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, Caxambu, MG, 6-9 de maio, 1995.
- Pimentel, M.C.B.; Lendingham, W.M.; Melo, E.H.M.; Lima Filho, J.L.; Durán, N. Effect of K^+ and Fe^{++} Concentration on Lipase Production by *Penicillium citrinum*. **XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq**, Caxambu, MG, 6-9 de maio, 1995.
- Miranda, O. A.; Salgueiro, A. A.; Pimentel, M.C.B.; Lima Filho, J. L.; Melo, E.H.M.; Durán, N. Lipase and/or Biosurfactant Production by *Penicillium citrinum* on by Production From Vegetal Oil Refinery. **XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)**, Caxambu, MG, 6-9 de maio, 1995.