

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

POTENCIALIDADE DO RESÍDUO DE CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*) NA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS LIPOLÍTICAS.

Viviane Brito Nogueira (Voluntária)

MANAUS
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB – B – 0053/2011
POTENCIALIDADE DO RESÍDUO DE CASTANHA-DO-BRASIL
(*Bertholletia excelsa*) NA PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
LIPOLÍTICAS.

Viviane Brito Nogueira (Voluntária)
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS
2012

Resumo

O presente estudo visou utilizar resíduos obtidos na manufatura de vegetais amazônicos, como fonte de carbono em fermentações semi-sólidas e líquidas, para a produção de enzimas lipolíticas, junto a sua caracterização para posterior aplicação industrial.

Para a produção do complexo de enzimas lipolíticas em fermentação líquida, 10^7 esporos/mL de um *Aspergillus* sp., foram inoculados em 25mL do meio líquido de Vogel (1956) contendo 2% da fonte de carbono (Castanha-do-brasil), em fermentações em condições estacionária e sob agitação de 150 rpm (*shaker*) a 28°C, por 168 horas. Na fermentação semi-sólida, o referido fungo foi inoculado em 2,5g do resíduo de Castanha-do-Brasil. As atividades lipolíticas e quantificação de proteína (método Bradford) foram analisadas quantitativamente a cada 24h por um período de 7 dias. A quantificação enzimática realizou-se utilizando um kit da marca *in vitro*. O melhor pH e temperatura de cultivo do micro-organismos foi analisada. Parâmetros foram estudados na dosagem enzimática, como a influência do pH e a estabilidade; a influência da temperatura e a estabilidade térmica; a influência de íons na reação enzimática. O perfil protéico foi analisado por eletroforese em sistema desnaturante (LAEMMLI, 1970), PAGE-SDS em placa, em gel de resolução a 1,2%, corado com prata.

Observou-se, pico de $13,404 \pm 1,4$ U/mL, em 96h de cultivo em fermentação líquida estacionária. Em fermentação líquida, sob agitação de 150 rpm (*shaker*) a 28°C, observou-se pico de $43,571 \pm 8,5$ U/mL, em 120h de cultivo, já em fermentação semi-sólida não foi observada atividade lipolítica. A agitação mostrou-se bastante significativa para excreção de lipases pelo fungo. Melhor pH e temperatura de cultivo do micro-organismo para maior produção de enzimas lipolíticas foi 4,0 e 22°C, respectivamente. O pH ótimo na reação enzimática foi de 9,5, se mantendo estável nos pHs 9,5, 10,0 e 10,5 por até 15 dias. Temperatura ótima de 37°C, sendo a atividade enzimática estável nas temperaturas 22°C, 37°C e 55°C por até 60 minutos. O KCl se mostrou ativador da reação lipolítica; CaCl₂, MgCl₂, NaCl e MnSO₄ se comportaram como inibidor. Foram observadas a presença de 3 bandas bem definidas no perfil proteico de 35kDa, 25kDa e 14kDa, contendo poucos contaminantes. Isto indica que se trata de uma amostra de fácil purificação futura.

Os resultados obtidos mostram que o *Aspergillus* sp., isolado do solo amazônico, é um bom produtor de enzimas lipolíticas, que quando combinada a mais estudos, pode tornar viável a aplicação industrial, principalmente por conta das características bioquímicas do complexo, consideradas bastante estáveis.

Abstract

The present study aimed to use residues obtained in the manufacture of amazonian's plants, such as carbon source in semi-solid and liquid fermentations, to produce lipolytic enzymes, together with its characterization for further industrial application.

To produce the complex of lipolytic enzymes in liquid fermentation, 10^7 spores/mL of *Aspergillus sp.* Were inoculated in 25mL of liquid médium of Vogel, containing 2% of carbon source (Brazil's nut) , in stationary fermentations and under agitation of 150 rpm (*shaker*) ar 28°C for 168 hours. In solid state fermentation, this fungus was inoculated into 2,5g of the residue of the Brazil's nut. The lipolytic activities and quantification of protein (Bradford mehod) were quantitatively anlyzed every 24 hours for a period of 7 days. The quantification was measured using a kit brand *In vitro*. The best pH and temperature of micro-organism growth was studied. Parameters were studied in enzyme dosage, as the influence of pH and stability, the influence of temperature and thermal stability and the influence of ions on the enzymatic reaction. The protein profile was analyzed by electrophoresis in denaturing system, SDS-PAGE plate, using gel resolution at 1.2%, with silver stained.

It was observed a peak of $13,404 \pm 1,4$ U/mL in 96h culture in stationary liquid fermentation. In liquid fermentation under agitation, there was a peak of $43,571 \pm 8,5$ U/mL in 120 hours og cultivation, and in solid fermentation was not observed lipolytic activity. The agitation proved to be very significant for the excretion of lipase by the fungus. Best pH and temperature of cultivation of the microorganism to increased production of lipolytic enzymes were 4.0 and 22 °C, respectively. The optimum pH in the enzyme reaction was 9,5, remained stable at pH 9,5, 10,0 and 10,5 for up to 15 days. Optimum temperature 37 °C and stable enzymatic activity at temperatures 22 °C, 37 °C and 55 °C for 60 minutes. KCl showed activator of lipolytic reaction, CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl and MnSO_4 behaved as inhibitor. We observed the presence of three well-defined bands in the protein profile of 35kDa, 25kDa and 14kDa, containing few contaminants. This indicates that this sample can be easy purified in the future.

The results show that *Aspergillus sp.*, isolated from Amazonian soil, is a good producer of lipolytic enzymes, which when combined with further studies, it can become viable industrial application, mainly because of the biochemical characteristics of the complex, considered quite stable.

*Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam
orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem
desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que
as cheias a baixam para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

Sumário

1.	INTRODUÇÃO-----	8
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA-----	9
2.1.	ENZIMAS-----	9
2.1.1.	DEFINIÇÃO DE ENZIMA-----	9
2.1.2.	CARACTERÍSTICA DAS ENZIMAS-----	9
2.2.	ENZIMAS LIPOLÍTICAS-----	10
2.3.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	10
2.4.	TIPOS DE FERMENTAÇÃO-----	12
2.4.1.	CULTIVO NO ESTADO LÍQUIDO (Cultivo Submerso) -----	12
2.4.2.	CULTIVO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES) -----	12
2.5.	FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS-----	13
2.5.1.	FONTE DE CARBONO-----	13
2.5.2.	PH-----	13
2.5.3.	TEMPERATURA-----	13
2.6.	MICRO-ORGANISMO EMPREGADO-----	13
2.7.	MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS-----	13
2.8.	CASTANHA-DO-BRASIL (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>) -----	14
2.9.	APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LIPASES-----	14
3.	DESCRIÇÃO METODOLÓGICA-----	15
3.1.	PRODUÇÃO DE LIPASES-----	15
3.1.1.	MICRO-ORGANISMO-----	15
3.1.2.	MEIOS DE CULTURA-----	15
3.1.3.	REPIQUE DO FUNGO-----	15
3.1.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS-----	15
3.1.5.	CONTAGEM DA SOLUÇÃO DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER-----	16
3.1.5.1	PROCEDIMENTO DE CONTAGEM-----	16
3.2.	SELEÇÃO DO MELHOR MÉTODO DE FERMENTAÇÃO-----	16
3.2.1.	FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES) -----	16
3.2.2.	FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO OU SUBMERSA (FSM) -----	17
3.3.	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO-----	17
3.4.	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH E ESTABILIDADE DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	17
3.5.	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	17
3.6.	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS LIPASES-----	18
3.7.	DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE -----	18
3.8.	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DAS LIPASES-----	18
3.9.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS-----	18
3.10	TRATAMENTO DE DADOS-----	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO-----	19
4.1.	SELEÇÃO DO MELHOR MODO DE FERMENTAÇÃO-----	19
4.2.	DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO-----	20
4.3.	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO-----	22
4.4.	DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO-----	23
4.4.1	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	23
4.4.2	ESTABILIDADE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM DIFERENTES PHs-----	24
4.4.3.	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	25
4.4.4.	ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA-----	26
4.4.5.	DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS LIPASES -----	27
4.4.6.	DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE -----	28

5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS -----	30
6.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES-----	30
7.	CRONOGRAMA-----	31
8.	REFERÊNCIAS-----	32

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro da tecnologia enzimática movimenta, de acordo com avaliação no ano de 2005, cerca de 147,2 milhões de dólares, correspondendo a 3,7% do mercado internacional (BON, 2008). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utiliza matérias primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria.

Os micro-organismos representam excelente fonte de enzimas devido à diversidade bioquímica, crescimento rápido, com requerimento limitado de espaço, o que diminui o custo de produção em relação às enzimas de origem animal ou vegetal e produção independente de variações sazonais e localização geográfica. Segundo Godfrey e West (1996) e Felix et al. (2004), após a descoberta de enzimas de origem microbianas, foram desenvolvidas técnicas para a produção em escala industrial, hoje 90% das enzimas aplicadas industrialmente é de origem microbiana.

O mercado mundial de enzimas industriais, conforme Pandey et al. (2005), é tão movimentado devido ao fato de que as enzimas microbianas apresentam atividade catalítica em geral muito maior do que os catalisadores sintéticos ou orgânicos (NELSON & COX, 2007). As enzimas possuem alta especificidade por seus substratos, atuam sobre condições suaves de temperatura, pH e pressão, resultando em significativa conservação de recursos naturais, utilizam substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais, há possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e pela facilidade de manipulação genética das linhagens, através de evolução dirigida, engenharia de proteínas ou tecnologia do DNA recombinante. Exigem poucos equipamentos e pouca energia, sem gerar produtos indesejáveis, beneficiando a indústria e o meio ambiente, pois não poluem os lençóis freáticos nem são carcinogênicas. (SAID & PIETRO, 2004; GODFREY & WEST, 1996; RAO et al., 1998; SCHIMID et al., 2001; KIRK et al., 2002). Alguns micro-organismos produzem baixa quantidade de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimização, possibilitam um aumento significativo do rendimento enzimático (KUMAR, 1999).

Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) representa vegetal com grande potencial econômico, utilizada em grande escala pela população Amazônica de diferentes formas, gerando resíduos ricos em sua composição, bastante complexos em componentes químicos, que podem ser utilizados de várias maneiras, inclusive como substratos para a produção de enzimas. Nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização desses resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. (PANDEY et al., 2000). Dentre estas enzimas encontram-se as lipases, empregada largamente em processos industriais.

A biodiversidade da Amazônia constitui uma fonte de valor altíssimo para inovação de tecnologias, sendo importantes estudos de micro-organismos que produzam eficientemente sistemas enzimáticos de interesse, a seleção de condições ótimas de produção, os quais são fundamentais para o desenvolvimento de processos biocatalíticos mais economicamente competitivos.

Neste contexto, o presente trabalho visou estudar a produção de enzimas hidrolíticas lipolíticas a partir de fungo filamentosso Amazônico da biblioteca microbiana do laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM - UFAM, com potenciais biotecnológicos, em meios líquidos e semi-sólidos, utilizando resíduos de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), e otimização das condições de cultura em relação ao pH e temperatura ótimos de produção dos complexos enzimáticos, assim como a caracterização parcial do extrato bruto na atividade enzimática.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENZIMAS

2.1.1 DEFINIÇÃO DE ENZIMA

Enzimas são proteínas altamente especializadas e que exercem a função de catalisadores das reações nos sistemas biológicos. Apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral, muito maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições suaves de pH e temperatura (NELSON & COX, 2007). Conforme Leadlay (1993), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de micro-organismos. Com sua ação, regulam a velocidade de muitas reações químicas presentes neste processo. No ano de 2004, conheciam-se cerca de 4.300 enzimas (seqüenciadas), 300 destas comercializadas (FERRER, 2004).

2.1.2 DENOMINAÇÃO DAS ENZIMAS

A denominação *enzima*, proposto em 1867 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymē*, que significa “em fermentação”. Os nomes sistemáticos incluem o substrato, a reação catalisada e a terminação *ase* (HARTMEIER, 1988). Apesar do esforço de sistematização, permanecem em uso, por razões históricas e comerciais, os nomes triviais, que conforme recomendação de IUB, de 1984, podem ser empregados em conjunto com o código da enzima (EC number). Este código é constituído de quatro algarismos. O primeiro refere-se à classe da enzima (de 1 a 6), o segundo à subclasse (tipo de ação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro à subclasse e o quarto refere-se AP número de ordem da enzima dentro da subclasse considerada. Têm-se para lipase (3.1.1.3).

2.1.3 CARACTERÍSTICA DAS ENZIMAS

A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte protéica, porém, ela pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (co-fatores) de natureza não protéica. Os cofatores podem ser íons (Zn^{2+} e Ca^{2+} etc.) ou moléculas orgânicas (co-enzimas). Exemplos são os dinucleotídeos (NAD, NADP, FAD) e a coenzima A, entre outros (NELSON e COX, 2007).

As enzimas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A denominada estrutura primária dessas macromoléculas corresponde à sequência desses aminoácidos, que é geneticamente determinada. As cadeias polipeptídicas, por sua vez, adotam configurações espaciais determinadas pela própria estrutura primária, bem como pelas interações entre seus aminoácidos constituintes. Assim, as interações entre aminoácidos adjacentes podem levar a arranjos espaciais do tipo α -hélice ou do tipo folha β , que compõem a denominada estrutura secundária. A estrutura terciária das enzimas resulta das interações entre aminoácidos, não sequencialmente próximos, que provocam torções e dobramentos de regiões da macromolécula. A estrutura tridimensional terciária configura o sítio catalítico da enzima, que é determinante para a sua atividade biológica. A estrutura quaternária refere-se à interação entre cadeias polipeptídicas e subunidades distintas e ocorre em algumas enzimas complexas de regulação (VOET e VOET, 1995).

A conformação e a estabilização da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima,

dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima, e em decorrência, suas propriedades.

A ação das enzimas é altamente específica. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato (ILLANES, 1995). Apenas alguns aminoácidos participam da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação de posicionamento da molécula de substrato. Outras sequências de aminoácidos têm importante papel na estabilização da estrutura tridimensional enzimática (LIMA et al., 2001). A classificação enzimática é feita a partir de seis classes principais (Tabela 1).

Tabela 1 – Classes de enzimas segundo a classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB) e atividade de catalisam.

Classe	Nome da classe	Atividade que catalisa
EC 1	oxidoredutases	reações de oxi-redução
EC 2	transferases	transferência de grupos funcionais
EC 3	hidrolases	reações de hidrólise
EC 4	liases	adicionam grupos a ligações duplas
EC 5	isomerases	reações de isomerização
EC 6	ligases	ligações acopladas à hidrólise de ATP

Fonte: Nelson e Cox, 2007

Lipases estão incluídas no grupo de hidrolases, participando de hidrólise de proteínas.

2.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases (Jaeger, 1999). A diferenciação entre uma lipase e uma esterase (EC. 3.1.1.1) está no fato de que a primeira catalisa reações de substratos insolúveis em água, enquanto que uma esterase age em substratos solúveis (Alvarez-Macarie, 1999).

Entretanto, a diferenciação entre lipases e esterases ainda não está completamente definida. Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir as lipases a partir de sua característica cinética, que é a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e emulsionados, ou seja, na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados, enquanto as esterases não apresentariam esta ativação, exercendo sua função hidrolítica sobre substratos solúveis em água.

2.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Segundo Lima (2001), a expressão da atividade de uma enzima é medida através da sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A ilustra o progresso de reações conduzidas com distintos teores iniciais de enzima. A concentração do produto formado aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo (velocidade de reação

constante). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade (valor da tangente à curva num dado instante) decresce. Vários fatores podem contribuir para esse decréscimo: diminuição da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição do produto e deslocamento do equilíbrio se a reação for reversível.

Em geral, a inibição pode ser reversível ou irreversível, no primeiro caso, a atividade enzimática é recuperada por diminuição da concentração do inibidor (diluição, diálise ou ultra filtração). A inibição irreversível é geralmente provocada por ligação covalente entre as moléculas de inibidor e enzima (BON, 2008).

Para evitar a influência de fatores que contribuem para o decréscimo, costuma-se associar a atividade enzimática à medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura a velocidade constante (fase linear das curvas da figura 1). É importante notar que nos processos industriais, as enzimas atuam em condições muito distantes daquelas vigentes para a reação a velocidade constante (condição inicial).

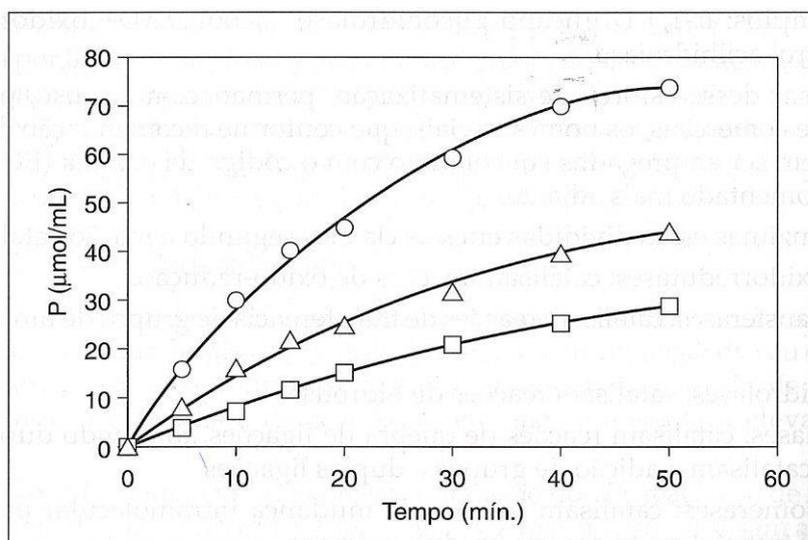


Figura 1 – Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais.

Fonte: LIMA, 2001

A escolha de um método para a determinação da atividade de uma enzima produzida por fermentação, requer conhecimento prévio da faixa de concentração enzimática que permite obter uma variação linear da concentração de produto (ou substrato) com o tempo, num intervalo que não seja suficientemente grande para que os fatores acima citados venham a interferir. Há métodos variados para avaliar a variação das concentrações das espécies, como a espectrofotometria. Certa variedade de condições de ensaio, bem como de métodos de determinação, é observada para uma mesma enzima, dependendo do produtor, do investigador ou do usuário. Assim, é sempre difícil comparar resultados de atividade enzimática obtido por diversos autores, em função da falta de definição de padrões consensualmente aceitos.

A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (unidade internacional – IU) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas. Em muitas situações emprega-se a atividade específica, que é expressa em unidades (IU) por massa de proteína (LIMA, 2001).

2.4 TIPOS DE FERMENTAÇÃO

A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, embora nos países orientais haja uma tradição estabelecida de utilização de fermentação semi-sólida. Algumas vantagens atribuídas a fermentação semi-sólida seriam os maiores riscos de contaminação, as necessidades de espaço e menores rendimentos (PRIEST, 1984). Entretanto, avanços tecnológicos estão sendo gradualmente incorporados a esse processo, podendo torná-lo interessante para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo, grupo de países no qual o Brasil se encontra.

2.4.1 CULTIVO NO ESTADO LÍQUIDO (Cultivo Submerso)

Os processos submersos possuem uma série de vantagens, segundo BON et al. (2008): Facilidade de controle de variáveis físico-químicas do processo; maior eficiência na absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula, levando menores tempos de processo e conseqüentemente, a ganhos em produtividade. E também desvantagens, tais como: elevados custos com aeração e agitação, especialmente quando o uso de meios reacionais com alta viscosidade e reologia complexa; e formação de espuma.

2.4.2 CULTIVO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES)

Mudgett (1986) e Oriol (1987) definiram como a fermentação na qual o crescimento de micro-organismos em substratos sólidos ocorre na ausência de todo líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos micro-organismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (SOCCOL, 1992).

Segundo BON, 2008, a fermentação no estado semi-sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade dos meios de cultivo (o substrato sólido pode requerer somente adição de água, embora outros nutrientes possam ser adicionados); ausência de requerimentos de máquinas e equipamentos sofisticados; possibilidade de uso de biorreatores com dimensões menores pelo fato do substrato estar concentrado; reduzido consumo de energia; baixo grau de umidade, reduzindo problemas de contaminação; condições de crescimento do micro-organismo semelhantes às encontradas em seu ambiente natural; maiores concentrações de enzima em relação às fermentações submersas; estabilidade da enzima excretada e baixo nível de repressão catabólica; ausência de formação de espuma; possibilidade de extração imediata do produto através da adição direta de solventes ou por filtração do meio fermentado; pequenas quantidades de águas residuais.

Existem, entretanto, fatores limitantes nas fermentações no estado semi-sólido, tais como: menor acessibilidade ao substrato; problemas de transferência de massa (oxigênio e nutrientes), calor e quantidade de movimento; dificuldades de controle de variáveis físico-químicas, tais como pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura; dificuldade no aumento de escala.

Diversas enzimas de importância industrial, como lipases e outras são produzidas por fermentação no estado semi-sólido (KRISHNA, 2005; COUTO E SANTOMÁN, 2006).

Dentre os micro-organismos, os fungos filamentosos, principais produtores das enzimas comerciais, são também os que melhores se adaptam à fermentação no estado sólido. Sua forma de crescimento em hifas e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica conferem aos fungos vantagens com relação aos micro-organismos unicelulares para a colonização de substratos sólidos (KRISHNA, 2005).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

2.5.1 FONTE DE CARBONO

As fontes de carbono são os principais substratos para a produção das enzimas de interesse. Resíduos agroindustriais de Castanha-do-Brasil mostram-se potenciais indutores das mesmas.

2.5.2 pH

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio em alguns casos elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA et al., 2003).

2.5.3 TEMPERATURA

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros físicos a ser observado em um processo fermentativo. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até ser alcançada a temperatura ótima; acima desta temperatura a enzima começa a perder sua função, diminuindo a velocidade da catálise, até o momento em que se torna inativa (GUPTA et al., 2003).

2.6 MICRO-ORGANISMO EMPREGADO

A primeira etapa da produção microbiana de uma enzima de interesse consiste na aquisição do micro-organismo produtor, que pode ser de linhagem selvagem ou modificada por genética clássica ou por técnicas de biologia molecular. A linhagem de interesse deve ser adquirida de condições de coleções de cultura científica ou de serviço, ou selecionada a partir de amostras de solo (como no presente trabalho), água, ar, tecido vegetais como caule ou frutas em decomposição, fezes de animais e vísceras de insetos como os cupins e outras fontes. Segundo Bon et al., 2008, o micro-organismo deve idealmente ter as seguintes características: ser seguro sob ponto de vista biológico (*status* GRAS – *generally recognized as safe*); apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima; suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica, a temperatura e a força iônica do meio; e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

2.7 MATÉRIA-PRIMA EMPREGADA

Os meios de cultivo são formulados através da utilização de compostos quimicamente conhecidos (meio sintético) ou de matérias-primas naturais. Do ponto de vista industrial, os meios sintéticos são muito caros, e a opção é feita geralmente por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agroindústria (LIMA, 2001), como Castanha-do-Brasil (resíduo agroindustrial).

Resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que devem apenas ser descartados, aqueles possuem valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORVIC, 1995). Os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais

ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG et al., 2003), tais como em fermentações para produção enzimática. Dessa forma, a crescente preocupação com a despoluição ambiental, somada a irreversível prevalência das políticas ambientais, abre espaço notável para o reuso desses resíduos, tal como o resíduo da Castanha-do-Brasil.

A matéria-prima é um dos componentes mais relevantes no custo de produção, podendo representar, em alguns casos, até 75% do custo total, sendo esta uma das razões para o crescente interesse.

2.8 CASTANHA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*)

A amêndoa de castanha-do-Brasil apresenta a seguinte composição química centesimal em g/100g: umidade 4,40, proteína bruta 17,00, lipídios 67,00, carboidratos 7,00, valor energético 751kcal e sais minerais 3,60, em média, além de quantidades elevadas de vitaminas E e B1. (COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA, 2000 e SOUZA, 1984). A fração albumina, a *excelsina*, é a única completa de origem vegetal conhecida, o que levou a castanha-do-Brasil ser chamada de *carne vegetal*. É uma amêndoa oleaginosa de elevado valor energético, rica em proteínas de alto valor biológico.

2.9 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE LIPASES

Lipases (E.C. 3.1.1.3 triacilglicerol éster hidrolases) no que se refere a aplicações, têm destaque na síntese de produtos de interesse nas áreas clínica, nutricional, ambiental, industrial e biotecnológica.

Na biotecnologia é empregada em diversos ramos industriais, como na indústria de óleoquímica, para a hidrólise e interesterificação regioseletiva de óleos e gorduras e síntese de biosurfactantes; na síntese de poliésteres biodegradáveis; na indústria farmacêutica, na síntese de intermediários de produtos biologicamente ativos, como naxopreno e ibufeno e na resolução de misturas racêmicas, como a síntese de Atenolol, medicamento usado no tratamento de hipertensão; na indústria de cosméticos: na síntese de ésteres como o palmitato de isopropila (emoliente em produtos para a pele e óleos de banho) e também na produção de biodiesel (Singh et al., 2008; Hasan et al., 2006).

3.DESCRICÃO METODOLÓGICA

Para a produção de lipases através de fermentações líquidas e sólidas utilizando resíduos de Castanha-do-Brasil como fonte de carbono e otimização de pH e temperatura, a partir do fungo isolado da microbiota Amazônica, utilizou-se o laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM, da UFAM. Pesquisa de cunho experimental para análises quantitativas.

3.1 PRODUÇÃO DE LIPASES

3.1.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo utilizado nos experimentos para produção de lipases foi isolado do solo da Universidade Federal do Amazonas, Setor Sul, em trabalhos anteriores. Dentre os isolados, o fungo designado F7 foi utilizado. O fungo foi submetido a análise morfológica e constatou-se tratar e um *Aspergillus sp.*

3.1.2 MEIOS DE CULTURA

Os Meios de cultura utilizados foram o BDA – contendo batata, água destilada, dextrose e ágar. O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi solidificado em tubos inclinados conforme mostra a Figura 2.



Figura 2 – Tubo Contendo Meio BDA Inclinado Para Repicagem Das Cepas
Fonte: SPIER, 2005.

3.1.3 REPIQUE DO FUNGO

Após a distribuição e solidificação dos meios BDA esterilizado em tubos de ensaio previamente esterilizados, procedeu-se a semeadura das cepas nas placas que posteriormente foram armazenadas em condição de cultivo a temperatura ambiente durante seis dias.

3.1.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS

Após o período de seis dias, na biomassa de fungo formada (micélio) na superfície do meio contido nos tubos foi adicionado 4mL de solução de sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentração de 0,5 mg/mL e homogeneizada. Em seguida, procedeu-se uma diluição, adicionando 100µL da solução de esporos em sulfato de amônio concentrada a 900µL de água destilada e deionizada estéril.

3.1.5 CONTAGEM DA SOLUÇÃO DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER

3.1.5.1 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM

A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer. Para a contagem, a suspensão de esporos foi adicionada sobre a Câmara de Neubauer, de acordo com a figura 3a. Foram contados todos os esporos presentes nos quadrículos ímpares, conforme a Figura 3b.

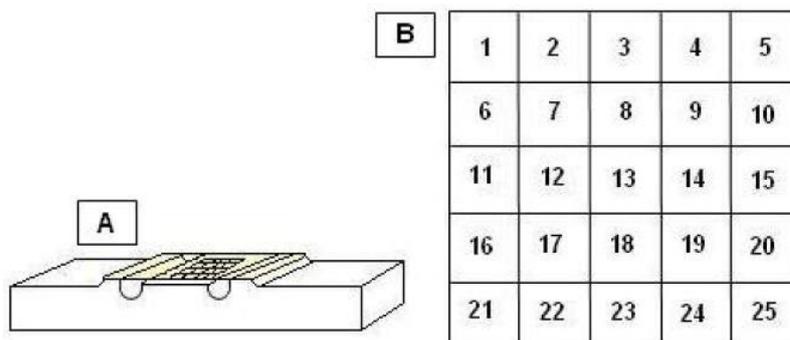


Figura 3 – Câmara de Neubauer (a) e quadrículos (b) para a contagem dos esporos

Fonte: SPIER, 2005

O resultado foi obtido usando a equação e expresso em número de esporos por ml de suspensão.

$$N = \frac{ne \cdot F}{nq \cdot Vq}$$

Onde:

F = fator de diluição (inverso da diluição);

N = número de esporos por ml de suspensão (esporos/ml);

ne = número total de esporos contados;

nq = número de quadrículos contados;

Vq = volume do quadrículo: 4×10^{-6} mL

3.2 SELEÇÃO DO MELHOR MÉTODO DE FERMENTAÇÃO

Para a produção das enzimas lipolíticas, foram utilizados dois tipos de fermentação: líquida e sólida.

3.2.1 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES)

A fermentação semi-sólida foi realizada a fonte de carbono de interesse, o resíduo de Castanha-do-Brasil.

Em erlenmeyers de 125mL foram adicionados 2,5g de resíduo de castanha-do-Brasil e estes foram esterilizados. Posteriormente, foi inoculada 1mL da solução de esporos em sulfato de amônio a 0,5mg/mL (item 3.1.4). Os erlenmeyer foram armazenados a temperatura de 25°C durante 7 dias, em condição estacionária. Foram realizadas filtrações a vácuo periódicas a cada 24h para coleta das amostras, armazenadas para análise em temperaturas baixas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO OU SUBMERSA (FSM)

A fermentação no estado líquido foi realizada com a fonte de carbono de interesse: o resíduo de Castanha-do-Brasil.

Em erlenmeyers de 125mL foram adicionados 2% do resíduo de castanha-do-Brasil em 25mL do meio fermentativo líquido de Vogel (1956) – contendo:

1. Uma solução de traços de elementos (micronutrientes) – 0,5mL da solução de traços por 100mL de meio: Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), Sulfato de Zinco Heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Sulfato de amônio e ferro hexahidratado ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), Sulfato de Cobre Pentahidratado ($Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$), Sulfato do manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$), Ácido Bórico (H_3BO_3), Molibdato do sódio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) e água destilada e deionizada.

2. Uma solução de sais de Vogel (macronutrientes) – 2mL da solução de sais por 100mL de meio: Citrato de Sódio Pentahidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$), Fosfato de potássio (KH_2PO_4), Nitrato de Amônio ($NH_4^+ + NO_3^-$), Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), H_2O destilada e deionizada.

3. Uma solução de Biotina: 0,1mg/mL – 0,5mL da solução Biotina por 100mL de meio líquido de Vogel.

Procedeu-se a esterilização. Posteriormente, foi inoculada 1mL da solução de esporos nos mesmos. Armazenou-se em temperatura ambiente durante 7 dias, realizando filtrações a vácuo periódicas de 24h em 24h para coleta das amostras, armazenadas para análise em temperaturas baixas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Os efeitos desses parâmetros foram avaliados em meio fermentativo anteriormente definido.

A influência do pH de cultivo foi verificada no meio líquido, utilizando diferentes sistemas tamponantes. Similarmente estudou-se o efeito de diferentes temperaturas sobre a produção das enzimas pelo micro-organismo selecionado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH E ESTABILIDADE DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação do pH de melhor atividade lipolítica, foram realizadas dosagens enzimáticas segundo metodologia descrita no item 3.9, diferindo no pH do tampão.

Para a realização do teste de estabilidade ao pH, incubou-se cada extrato enzimático, durante 24 horas, a temperatura ambiente, em tampão apropriado. Após esse período determinou-se a atividade lipolítica. O extrato bruto e diluído também foram submetidos ao procedimento, para fins comparativos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na atividade lipolítica foi analisado segundo metodologia descrita no item 3.9, no entanto, submeteu-se a reação enzimática a diferentes temperaturas, a saber: 5°C; 22°C; 37°C; 55°C e 75°C.

Para a realização do teste de estabilidade à temperatura, incubou-se cada extrato enzimático durante diferentes tempos (5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos) em diferentes temperaturas (22°C, 37°C e 55°C). Após este período, determinou-se a atividade lipolítica residual (% de atividade comparada com a encontrada quando a dosagem enzimática será realizada segundo metodologia descrita no item 3.9). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS LIPASES

Foram adicionados KCl, NaCl, MgCl₂, ZnCl₂ e MnSO₄ em diferentes ensaios enzimáticos e atividade mensurada segundo metodologia descrita no item 3.9. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE

O perfil protéico foi estudado por eletroforese em sistema desnaturante (LAEMMLI, 1970), PAGE-SDS em placa, em gel de resolução a 12%, corando com prata.

3.8 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DAS LIPASES

A atividade de lipases foi determinada utilizando kit para dosagem da marca *In vitro*. Segundo a tabela 2.

Tabela 2 - Dosagem Enzimas lipolíticas – Kit *In Vitro*

	Ensaio	Controle	Branco
Tampão	50µL	50 µL	
Amostra	2,5 µL	2,5 µL	
Inibidor	1 µL	1 µL	63,5 µL de H ₂ O
Reagente	5 µL	5 µL	
Incubar por 2 minutos a 37°C			
Substrato	5 µL	-----	-----
Incubar por 30 minutos a 37°C			
Interromper a reação 100 µL INA			
Substrato	-----	5 µL	-----

3.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada, em triplicata, pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.10 TRATAMENTO DE DADOS

Todos os experimentos serão realizados em triplicata e os valores obtidos serão apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi assumida o valor de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DO MELHOR MODO DE FERMENTAÇÃO

Foi estudada a atividade enzimática durante 7 dias de cultivo, a 28°C, utilizando o resíduo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono, em dois meios fermentativos (semi-sólido ou líquido), tendo sido realizadas dosagens enzimáticas periódicas a cada 24 horas. Na cinética de produção na fermentação líquida em modo estacionário, observou-se pico de 13,404 ± 1,4 U/mL e 140,728 U/mg de proteína com 96h de cultivo, de acordo com a tabela 3.

Em fermentação líquida, sob agitação de 150 rpm em *shaker* a 28°C, detectou-se pico de 43,571 ± 8,5 U/mL e 349,738 U/mg de proteína, com 120h de cultivo, como mostra a tabela 4. Baron (2008) obteve 61,0 ± 1,3 U/mL, no entanto, esta atividade foi resultante de um cultivo já otimizado, indicando que após a otimização a produção enzimática, resultados significativos podem ser observados.

Tabela 3 – Atividade lipolítica, excretado por um fungo filamentosso amazônico *Aspergillus ssp.*, em meio líquido de Vogel modo estacionário a 28°C, contendo 2% de resíduo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono.

Tempo de cultivo (horas)	Atividades (U/mL)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
24	nd	nd	Nd
48	nd	nd	Nd
72	nd	nd	Nd
96	13,404	1,44	6,6
120	4,976	0,32	6,62
144	3,547	0,83	23,59
168	2,976	0,5	16,85

nd = não detectável

Tabela 4 – Atividade lipolítica, excretado por um fungo filamentosso amazônico *Aspergillus sp.*, em meio líquido de Vogel sob agitação de 150 rpm a 28°C, contendo 2% de resíduo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono.

Tempo de cultivo (horas)	Atividades (U/mL)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
24	1,428	0,3	21,21
48	13,5	2,1	15,6
72	17,714	1,9	10,8
96	41,833	2,8	6,84
120	43,571	8,5	19,7
144	24,642	4,2	17,1
168	34,5	5,1	14,8

Os dados obtidos nos dois processos fermentativos indicam que a fermentação líquida sob agitação de 150 rpm foi bastante superior, obtendo resultados de 3,25 vezes superiores aos valores obtidos no processo fermentativo estacionário para a produção do referido complexo enzimático; aumentando apenas 24 horas de cultivo. Isso mostra que a agitação influenciou de forma significativa a excreção de lipases.

Vários tempos de cultivo de produção de lipases extracelular tem sido relatados na literatura, refletindo a variabilidade na produção lipolítica em diferentes médias de tempo, assim como várias médias de produção enzimática. Damaso et al. (2008), utilizando o fungo *Aspergillus niger*

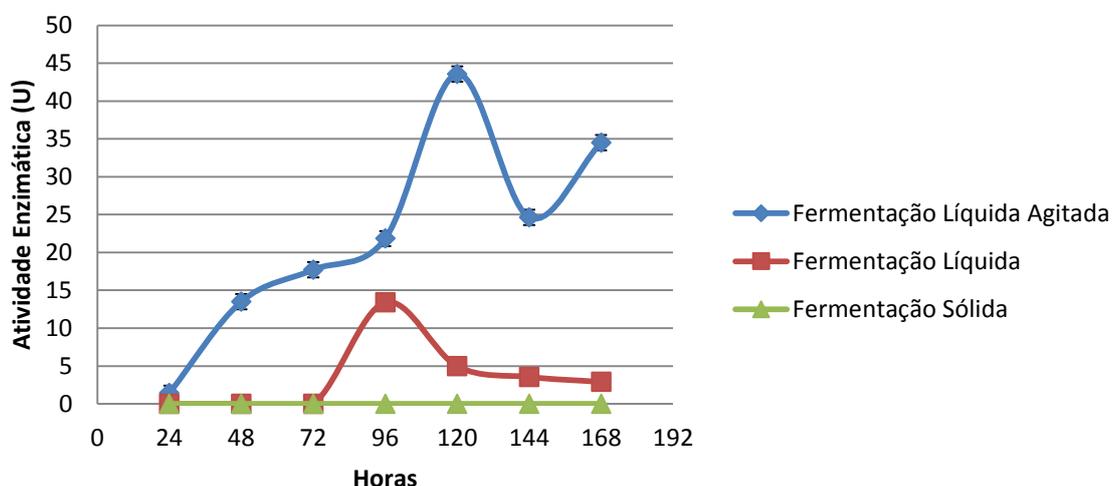
em fermentação semi-sólida com farelo de trigo, obteve melhores resultados com 48h de cultivo. Já Oliveira (2010), obteve melhor produção com 72h de cultivo, utilizando *Fusarium ssp.*

Observa-se que a atividade lipolítica atinge um máximo e decai, e isto sugere uma menor disponibilidade de nutrientes ou a liberação de metabólitos tóxicos (ROMERO et al., 2001).

Após as fermentações líquidas em diferentes modos, foi realizado o ensaio fermentativo em meio semi-sólido, consistindo apenas no resíduo da castanha-do-Brasil junto ao inóculo de 1mL da solução de esporos, em sulfato de amônio a 0,5mg/mL, do *Aspergillus sp.* Neste experimento não foi detectada nenhuma atividade lipolítica, quando em temperatura ambiente, sem agitação. A figura 4 mostra cinética de produção nos 3 diferentes experimentos comparadas: Fermentação líquida estacionária e agitada, e fermentação semi-sólida.

Figura 4 – Cinética de Produção de Enzimas Lipolíticas em diferentes modos fermentativos, indicando a Fermentação Líquida sob agitação a melhor alternativa.

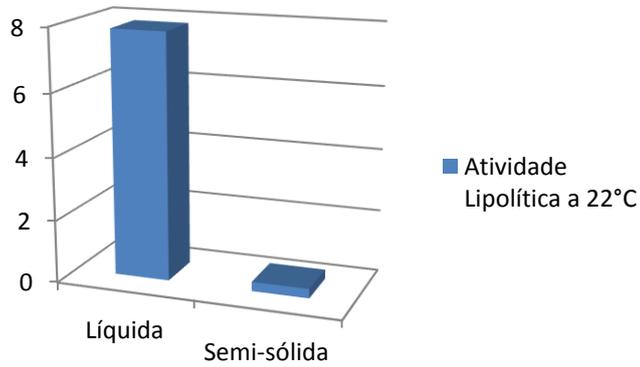
Cinética de Produção de Enzimas Lipolíticas



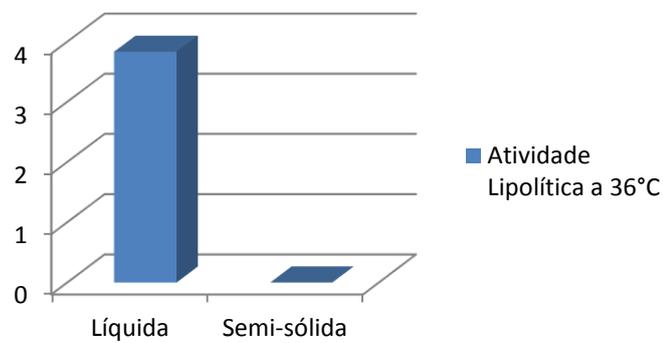
4.2 DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Para determinação da melhor temperatura de produção do complexo enzimático lipolítico, foram testadas temperaturas de 22°C, 36°C e 40°C, tanto em fermentação líquida, quanto em fermentação semi-sólida, visto que a temperatura poderia influenciar significativamente a produção. As atividades estão expressas na figura 5.

Atividade Lipolítica a 22°C



Atividade Lipolítica a 36°C



Atividade Lipolítica a 40°C

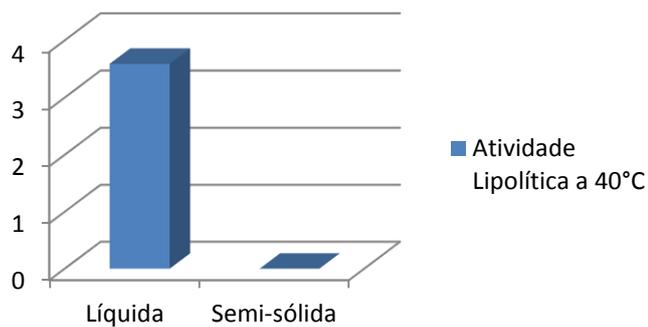


Figura 5 – Representação da atividade lipolítica em Fermentação Líquida e Semi-sólida, em diferentes temperaturas de cultivo do micro-organismo em Castanha-do-Brasil: 22°C, 36°C e 40°C. Nota-se a temperatura de 22°C como a melhor para produção do complexo enzimático.

A melhor produção de enzimas lipolíticas foi em fermentação líquida a 22°C ($7,833 \pm 0,4$ U/mL e $118,352 \pm 0,9$ U/mg de proteína). A produção enzimática mostrou-se bastante superior em 22°C em relação às outras temperaturas, assim como a fermentação líquida mostrou-se superior à sólida, confirmando a melhor produção em fermentação líquida independente da temperatura. Na literatura, a temperatura de 37°C foi definida como ótima para as lipases produzidas por Fadiloglu e Soylemez (1997), que utilizaram *Candida rugosa* como micro-organismo produtor da enzima, e para a lipase de *Penicillium restrictum*, estudada por Freire et al. (1997).

4.3 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

A influência do pH na produção enzimática foi estudada, pois a mudança no potencial hidrogeniônico poderia acarretar em uma mudança significativa na produção enzimática. Foram testados pH entre 3 e 10,5, como pode ser visto na figura 6.

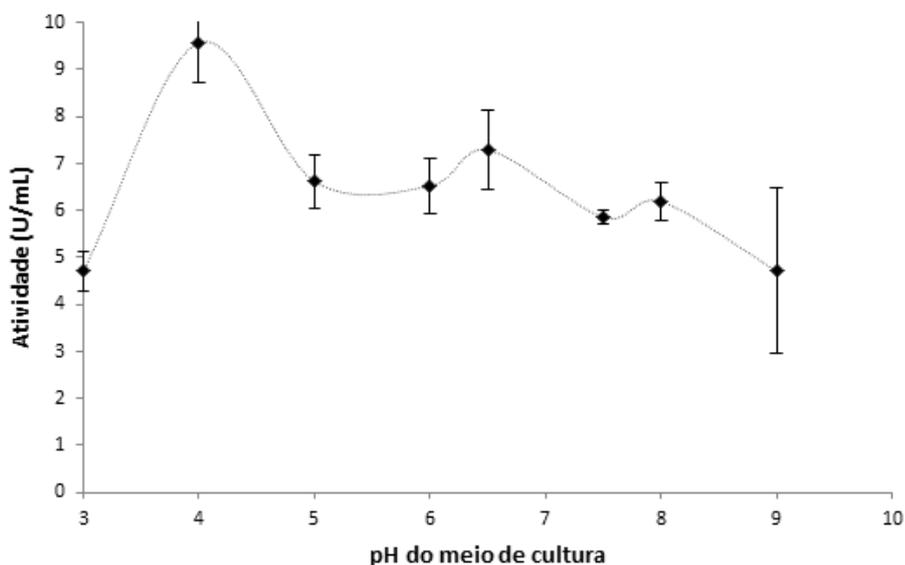


Figura 6 – Influência do pH na produção do complexo lipolítico

O melhor pH de produção para o complexo lipolítico foi pH 4,0, com atividade enzimática de $9,571 \pm 0,8$. O fungo *Aspergillus* sp. utilizado neste estudo foi isolado do solo amazônico. De acordo com Longo e Espíndola (2000), o solo amazônico é considerado ácido, de maneira a justificar a maior produção de lipases quando este micro-organismo foi submetido a fermentação em meio ácido. Kumari et al. (2009) realizaram a otimização da produção de lipase utilizando o micro-organismo *Enterobacter aerogenes*, e seus resultados mostraram que a melhor condição para a produção de lipase em pH 7,0.

4.4 DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos na atividade lipolítica, foi utilizado o extrato enzimático bruto obtido por fermentação líquida com agitação, durante 120h (5 dias), a 22°C, em pH 4,0.

4.4.1 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito do pH na atividade lipolítica foi analisada entre pH de 2 a 10,5. Detectou-se um máximo de atividade enzimática em pH 9,5 ($51,380 \pm 0,9$ U/mL), como pode ser observado na Figura 7.

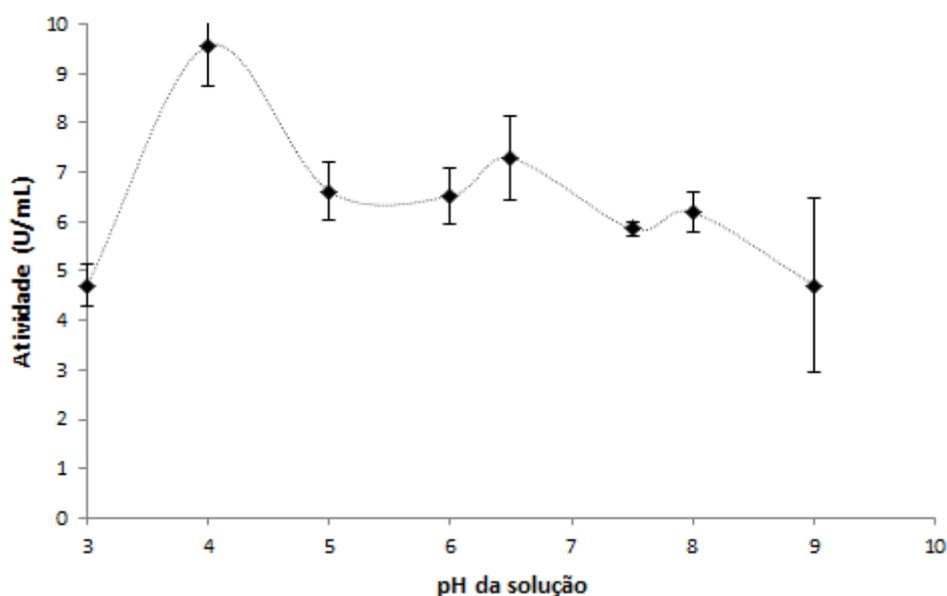


Figura 7 – Teste de melhor pH para dosagem enzimática de lipase utilizando Kit da marca *InVitro*, indicando o pH 9,5 como o melhor.

Várias lipases atuam em pH alcalino. Isto foi observado para espécies de *Bacillus stearothermophilus* MC7 (pH 7,5-9,0) (KAMBOUROVA et al., 2003), *Pseudomonas fluorescens* HU380 (pH 8,5) (KOJIMA; SHIMIZU, 2003) e *Staphylococcus xylosus* (pH 8,5) (MOSBAH et al., 2007). Existem lipases que atuam em ampla faixa de pH, como a de *Staphylococcus epidermidis* (pH entre 2,0 e 10,0) (SIMONS et al., 1998) e *Bacillus megaterium* (pH entre 4,0 e 12,0) (RUIZ et al., 2002). Já a lipase de outra linhagem de *Bacillus megaterium* apresentou atividade em uma faixa de pH mais restrita (entre 5,0 e 7,0) (LIMA et al., 2004).

A lipase produzida neste estudo apresentou atividade entre pH 5,0-10,5, sendo os valores mais altos entre pH 9,5 e 10,5. Dessa maneira, foi realizado testes de estabilidade frente a esses pHs de maneira a definir não somente o pH ótimo de catálise enzimática, mas também o quanto ele se mantém estável neste pH ótimo.

4.4.2 ESTABILIDADE DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA EM DIFERENTES PHS

Nos três pHs analisados: 9,5, 10,0 e 10,5 foi observada alta estabilidade durante a reação enzimática. Os valores, que estão expostos na figura 8, são referentes a estabilidade de pH medida em duas ocasiões: com 24h e 15 dias de incubação do extrato bruto enzimático produzido por fermentação de *Aspergillus* sp. com Tampão Glicina em seus respectivos pHs de análise, em temperatura ambiente. Foi observada atividade residual de 100% em 24h no pH 9,5, e em 15 dias nos três pHs testados. Nos pHs 10,0 e 10,5 obteve-se atividade residual de 96 e 85%, respectivamente.

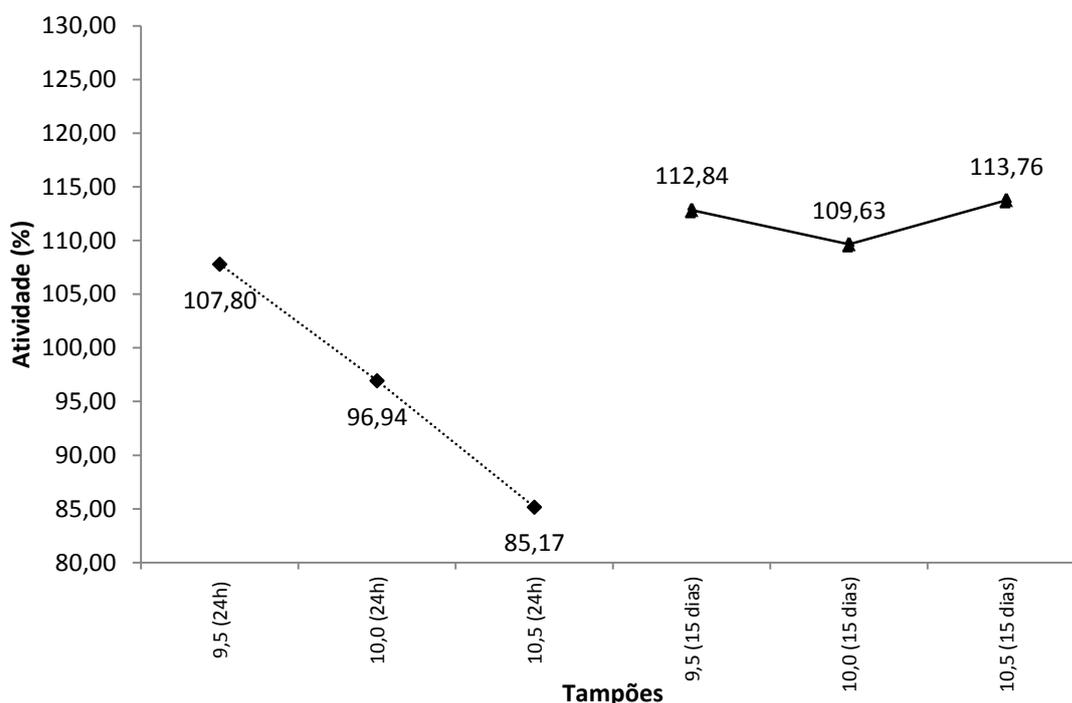


Figura 8 – Estabilidade de pH (9,5, 10,0 e 10,5) durante 24h e 15 dias.

A maioria das lipases conferem atividade em faixa de pH entre 3 e 12, em relação à estabilidade ao pH (GUPTA et al., 2004). Quando o pH do meio propicia a ausência de cargas na estrutura da enzima, diz-se que este valor de pH é o ponto isoelétrico (pI) da enzima, neste ponto as forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas das enzimas tornam-se mínimas. O ponto isoelétrico (pI) comumente determinado para lipases bacterianas têm sido valores variados, geralmente entre 4 e 10. Entretanto, lipases fúngicas e de leveduras está entre 4 e 6, com algumas exceções com valores entre 7 e 9 (LIMA et al., 2004).

4.4.3 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na atividade lipolítica foi analisado em 5°C; 22°C; 37°C; 55°C; e 75°C. Foram detectados máximos de atividade de $13,04 \pm 1,7$ U/mL a 22°C, de $72,09 \pm 0,4$ U/mL a 37°C e de $38,90 \pm 5,35$ U/mL a 75°C (Figura 9).

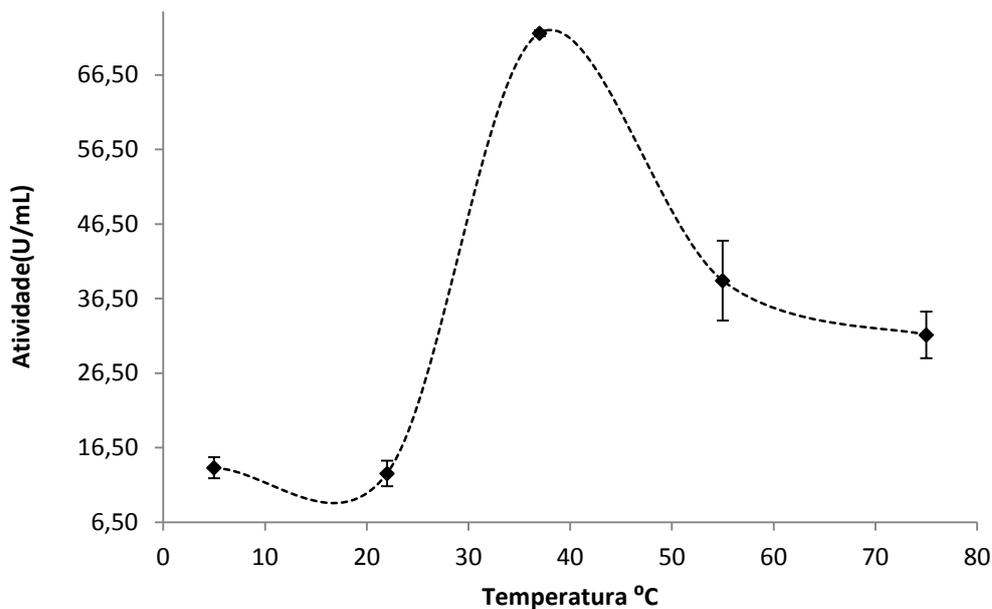


Figura 9 – Atividade lipolítica frente a diferentes temperaturas, indicando a 37°C como a melhor temperatura para a dosagem enzimática.

As características cinéticas das lipases microbianas variam dependendo do micro-organismo, gênero, espécie e também da cepa. Lima et al. (2004) relataram que uma lipase de *Bacillus megaterium* apresentou temperatura ótima de reação a 55°C, enquanto outras lipases bacterianas apresentaram atividade máxima acima dos 70°C, como as de *Bacillus stearothermophilus* MC 7 (KAMBOUROVA et al., 2003), chegando até mesmo aos 90°C, como a carboxilesterase da arqueobactéria *Pyrobaculum calidifontis* (Hotta et al., 2002).

4.4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram observados resultados bastante satisfatórios frente à estabilidade térmica, visto que em todos os testes pode ser observada a manutenção da atividade residual entre 71,70-100% (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade residual de lipase frente a diferentes temperaturas e tempos de reação.

Tempo	22 °C	37 °C	55 °C
5'	80,29%	49,48%	81,04%
10'	83,28%	67,22%	95,05%
20'	78,61%	71,70%	100%
30'	100%	100%	100%
40'	100%	100%	100%
50'	100%	100%	100%
60'	100%	100%	85,99%

Observou-se pico de atividade de $73,09 \pm 3,33$ U/mL a 55°C, na reação enzimática realizada por 60 minutos, como é mostrado na figura 10. Pode ser detectado uma temperatura e tempo de reação que potencializou a atividade enzimática, visto que o máximo de atividade na reação segundo o protocolo do Kit *InVitro* foi de 51,0 U/mL.

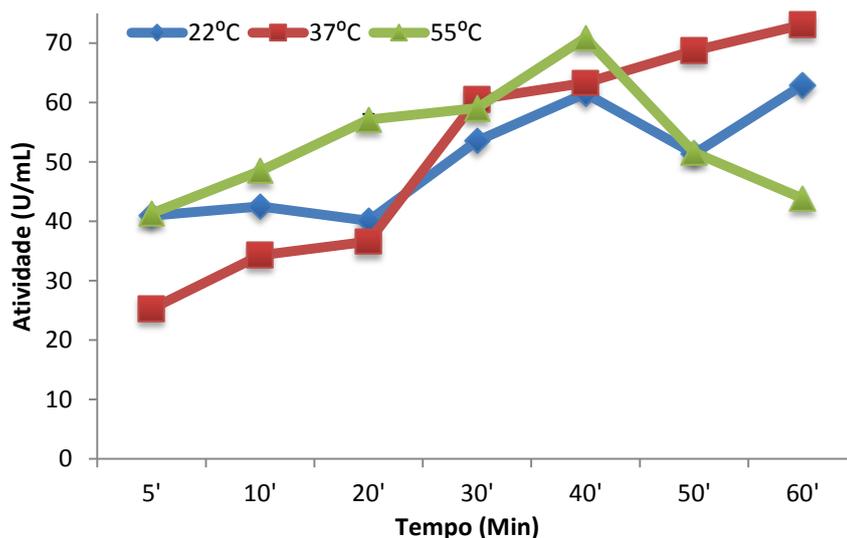


Figura 10 – Estabilidade térmica de lipases, diferentes tempos e temperaturas.

A estabilidade térmica é uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura. Lipases oriundas de bactérias termofílicas tem papel importante na indústria devido a elevada estabilidade em altas temperaturas (JAEGER; REETZ, 1998). Lipases psicofílicas, também merecem atenção, pois apresentam elevada atividade em temperaturas muito baixas; propriedade esta de grande importância na síntese de determinados intermediários orgânicos quirais termossensíveis. Micro-organismos adaptados ao frio são fontes potenciais de lipases psicofílicas (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008). Assim como aqueles adaptados ao calor.

Não existe um protocolo padrão para determinar a termoestabilidade das lipases microbianas, o que dificulta a comparação entre elas. A lipase da bactéria halofílica *Natronococcus* sp. incubada durante 60min a 50°C, permaneceu com 90 % da atividade residual (BOUTAIBA et al., 2006); a de *Streptomyces coelicolor* após 30min, a 70°C, apresentou atividade residual em torno de 60-80 % (CÔTÉ; SHARECK, 2008); a 100 °C e durante 2h, a carboxilesterase de *Pyrobaculum calidifontis* não diminuiu sua atividade (HOTTA et al., 2002).

4.4.5 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS LIPASES

As dosagens foram realizadas com a presença de diferentes substâncias, a saber: KCl, CaCl₂, NaCl, MgCl₂, e MnSO₄, a concentração de 10mM. Observou-se atividade de 66,19 ± 6,16 U/mL quando havia KCl no meio reacional, 29,09 ± 3,53 U/mL quando havia MgCl₂, 9,66 ± 0,20 U/mL quando havia CaCl₂, 23,09 ± 4,04 U/mL quando havia MnSO₄, e 45,04 ± 2,82 U/mL quando havia NaCl (figura 11).

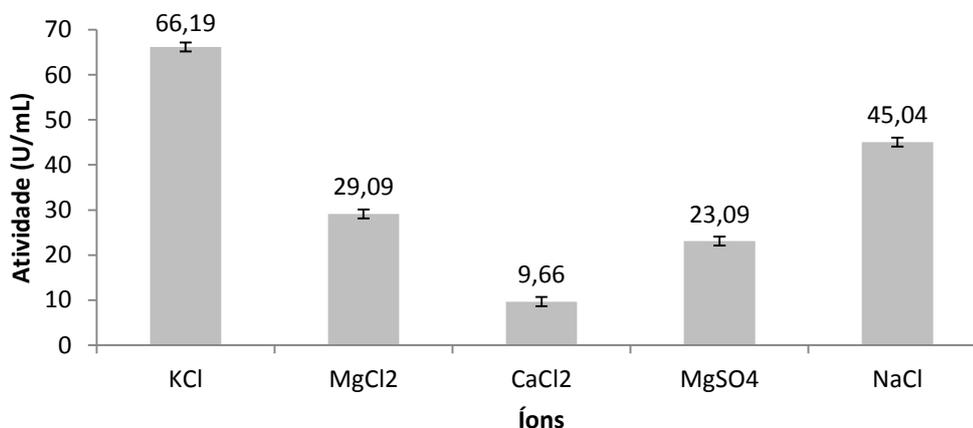


Figura 11 – Influência de KCl, CaCl₂, NaCl, MgCl₂, e MnSO₄ na atividade lipolítica.

Quando comparadas a reação controle do experimento, a qual não continha nenhuma substância, observou-se atividade residual alta para algumas substância, e baixa para outras, como pode ser observado na figura 12.

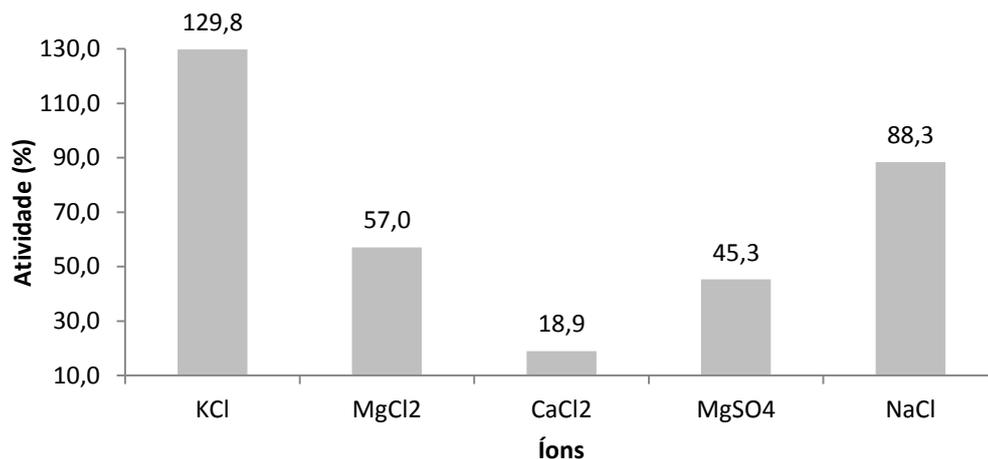


Figura 12 – Influência de substâncias na atividade lipolítica, comparada ao controle, em porcentagem.

Os íons podem exercer um papel inibidor ou estimulador por meio da sua associação com as enzimas (GUPTA et al., 2004). Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como Ca_{2+} ou Mg_{2+} , enquanto outras exigem um íon específico para a catálise (BORZANI et al., 2008).

O KCl se mostrou ativador da reação enzimática, aumentando 29,8% da atividade quando presente no meio reacional. Já MgCl_2 e MnSO_4 se comportaram como inibidor, diminuindo próximo a metade a atividade enzimática (57% e 45,3% de atividade residual, respectivamente). Quando NaCl estava presente no meio reacional, 88,3% da atividade enzimática se manteve, ou seja, a interferência não foi tão alta. Já CaCl_2 se mostrou um potente inibidor da atividade lipolítica, visto que a atividade residual foi de apenas 18,9%.

Brune e Gotz (1992), e Rashid (2001) testaram a influência de alguns íons na lipase de *Pseudomonas* sp. e notaram que a atividade foi inibida pelo Zn_{2+} , Fe_{2+} e Fe_{3+} , e ativada pelo Ca_{2+} , Mn_{2+} e Sr_{2+} , respectivamente, diferente do obtido neste estudo, que o íon Ca_{2+} foi um forte inibidor.

Wang et al. (2009) avaliaram o comportamento de uma lipase termoestável de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 perante a diferentes soluções iônicas e reagentes. A enzima neste estudo foi fortemente ativada pelo Mg_{2+} , Ca_{2+} , Cu_{2+} , Zn_{2+} , Co_{2+} , e aparentemente inibida pelos reagentes ácido etilenodiamino tetra acético, fenilmetilsulfonil e ditiotreitol. Liu et al. (2008) produziram, purificaram e caracterizaram uma lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3, e neste caso, a enzima foi fortemente inibida pelo íons Hg_{2+} , Fe_{2+} e Zn_{2+} e pelos solventes fluoreto fenilmetanosulfonil e ácido iodoacético.

4.4.6 DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE

O perfil protéico foi analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), amplamente utilizada para análise de proteínas em uma mistura complexa, pois permite a separação dos componentes da mistura de acordo com seu peso molecular. Após a separação eletroforética, a coloração por prata foi realizada. No estudo, foram separados proteínas por peso molecular, o qual pode ser observado na figura 13 de aproximadamente: 35 kDa, 25 kDa e 14kDa. Foram calculados o R_f de cada proteína observada, o que leva em consideração a distância percorrida pela molécula e a distância percorrida pela linha de frente. Obteve para a proteína de 35kD um R_f de 0,44, para a

proteína de 25kDa um Rf de 0,67 e para a proteína de 14kDa, Rf de 1. Uma fração de fraca intensidade também foi observado próximo a 50kDa.

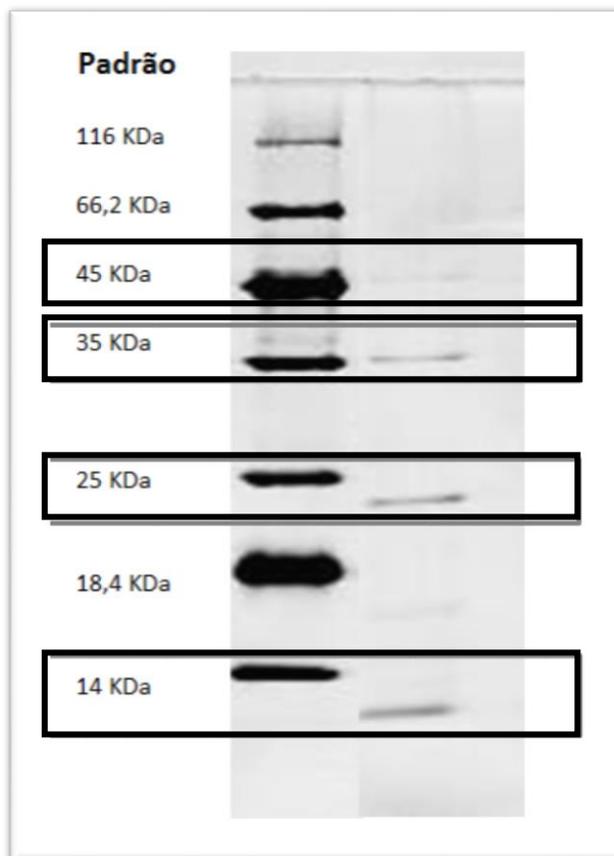


Figura 13 – Perfil protéico em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

De modo geral, a massa molecular das lipases microbianas varia entre 20 e 60 kDa (MALA; TAKEUCHI, 2008). A lipase de menor estrutura conhecida pertence à bactéria anaeróbica *Propionibacterium acidi-propionici* que apresentou massa molecular entre 6,0-8,0 kDa (SARADA; JOSEPH, 1992). Uma exceção de massa molecular mais alta, pode ser representada pelas lipases das bactérias psicrotólicas isoladas de sedimentos de mar profundo do oeste Pacífico, *Psychrobacter* sp. wp37 e *Pseudoalteromonas* sp. wp27, cuja massa molecular foi 85 kDa (ZENG et al., 2004).

Nos diversos estudos relatados na literatura com as mais diversas técnicas mostram que as lipases possuem predominância de 19 à 60 kDa (GAUR et al., 2008; LIU et al., 2008; LESUISSE et al., 1993).

Park et al. (2007) purificaram em cromatografia de troca iônica e caracterizaram lipase hepática de *Tarodes pacifus*. Os resultados obtidos mostraram que a massa molecular da enzima foi 27 kDa, determinado pela técnica SDS-page.

Liu et al. (2008) produziram, purificaram e caracterizaram uma lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 utilizando a técnica do SDS-Page, por meio da qual foi determinada a massa molecular da lipase de 63,5 kDa. Neste caso, a enzima foi fortemente inibida pelo íons Hg^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} e pelos solventes fluoreto fenilmetanosulfonil e ácido iodoacético.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma das maiores aplicações industriais das lipases tem sido como aditivos em detergentes (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando os lipídeos e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água (PANDEY et al., 1999). Estas hidrolases são adicionadas em detergentes líquidos e sólidos, domésticos e industriais, e devem ser estáveis em pH alcalino, em altas temperaturas. A principal vantagem do uso de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). As características do complexo bioquímico analisadas neste estudo condizem com os requisitos para a aplicação na indústria de detergentes.

6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

- O melhor método fermentativo para a excreção de enzimas lipolíticas pelo fungo *Aspergillus* sp. foi em condição líquida, utilizando o meio líquido de Vogel acrescido com Castanha-do-Brasil, sob agitação, com pico de $43,571 \pm 8,5$ U/mL, em 120h de cultivo.
- O melhor pH e temperatura de cultivo do micro-organismo para maior produção de enzimas lipolíticas foi 4,0 e 22°C, respectivamente.
- Parâmetros foram estabelecidos na dosagem enzimática, sendo considerados os máximos de atividade lipolítica obtidos: pH ótimo de 9,5, se mantendo estável nos pHs 9,5, 10,0 e 10,5 por até 15 dias. Temperatura ótima de 37°C, sendo a atividade enzimática estável nas temperaturas 22°C, 37°C e 55°C por até 60 minutos.
- O KCl se mostrou ativador da reação lipolítica; CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl e MnSO_4 se comportaram como inibidor.
- Foram observadas a presença de 3 bandas bem definidas no perfil proteico de 35kDa, 25kDa e 14kDa, contendo poucos contaminantes. Isto indica que se trata de uma amostra de fácil purificação futura.
- Os resultados obtidos mostram que o *Aspergillus* sp., isolado do solo amazônico, é um bom produtor de enzimas lipolíticas, que quando combinada a mais estudos, pode tornar viável a aplicação industrial, principalmente por conta das características bioquímicas do complexo, consideradas bastante estáveis.

7. CRONOGRAMA

Descrição	Ago 2011	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2012	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão de Literatura.	x	X	x	x	X	x	x	x	x	X	x	
Tratamento da matéria-prima.		X										
Adaptação da metodologia.		X										
Screening para seleção dos micro-organismos produtores das enzimas lípases.		X	x	x								
Seleção do método de fermentação a ser utilizado para a produção da enzima.					x	x	x					
Otimização da produção das enzimas lípases: avaliar pH e temperatura.								x	x	X		
Caracterização bioquímica de lipases.									x	x	x	X
Análise de dados	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X
Preparação do relatório e apresentação final.											x	x

8. REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-MACARIE, E.; AUGIER-MAGRO, V.; GUZZO, J.; BARATTI, J.; *Biotechnol. Lett.* v.21, p.313. 1999.
- ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; JR, F. P. *Produção não-madeira e desenvolvimento Sustentável na Amazônia*. Instituto de Química. Laboratório de Tecnologia Química – LATEQ. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil. 2007.
- BARON, A. M. *Preparação e caracterização de lipases imobilizadas para utilização em biocatálise*. Tese – Programa de Química – UFPR. Curitiba. 2008.
- BON, E. P. S. FERRARA, M. A. CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia*. Ed. Interciência. Rio de Janeiro. 2008.
- BOUTAIBA, S.; BHATNAGAR, T.; HACENE, H.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C. *Preliminary characterization of a lipolytic activity from an extremely halophilic archeon, Natronococcus sp.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Amsterdam, v. 41, p. 21-26. 2006.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia industrial: fundamentos*, São Paulo, Ed. Blücher. 2008.
- BRUNE, A.K.; GOTZ, F. *Degradation of lipids by bacterial lipases*. Microbial degradation of natural products, VCH. Weinheim. p. 243–266. 1992.
- BRADFORD, M.M. *A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. v. 72, p.248-254. 1976.
- COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA DE XAPURI-AC. *Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa, H. B.K.)*. Rio Branco [s.n.]. 2000.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. *Application of solid-state fermentation to food industry – A review*. J. Food Eng. v.76, p.291-302. 2006.
- CÔTÉ, A.; SHARECK, F. *Cloning, purification and characterization of two lipases from Streptomyces coelicolor A3(2)*. Enzyme and Microbial Technology. New York, v. 42, p. 381-388. 2008.
- DEMAJORIVIC, J. *Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades*. Revista de Adm. De Empresas. v.35(3), 88-93p. 1995.
- FADILUĞLU, S.; SOYLEMEZ, Z. *Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil*. Food Research International. v. 30, n.3-4, p.171-175. 1997.
- FELIX, R.F.; NORONHA, E.F.; De MARCO, J.L. *Proteases: características e aplicações industriais*. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis summa. p.327-347. 2004.

FERRER, M. *Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables*. Sociedad Española de Microbiología Actualidad. v.38, p.11-17. 2004.

FREIRE, D. M. G.; GOMES, P. M.; BOM, E. P. S.; SANT'ANNA JR., G. L. *Lipase production by a new promising strain of *Penicillium restrictum**. Revista de Microbiologia. v. 28, n. 1, p. 6. 1997.

GAUR, R., GUPTA, A., Khare, S. K. *Purification and characterisation of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA*. Process Biochem. v.43, p.1040-1046. 2008.

GODFREY, T.; WEST, S. *Introduction to industrial enzymology*. In: GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial enzymology*. New York: Macmillan Publishers, inc., 2ed., p.1-8. 1996.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. *Microbial α -amylases: a biotechnological perspective*. Process Biochem. v.38, p.1599-1616. 2003.

GUPTA, R., GUPTA, N., RATHI, P. *Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties*. Appl. Microbiol. Biotechnol. v.64, p.763-782. 2004.

HARTMEIER, W. *Immobilized biocatalysts: an introduction*. Berlin: Springer Verlag, 1988.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. *Industrial applications of microbial lipases*. Enzyme Microb. Technol., v. 39, n. 2, p. 235-251. 2006.

HOTTA, Y.; EZAKI, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. *Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic Archaeon*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, p. 3925-3931. 2002.

ILLANES, A. *Biotecnología de enzimas*. Valparaiso: Editora de la Universidad Católica de Valparaiso. 1994.

JAEGER, K-E; REETZ, M. T. *Microbial lipases form versatile tools for biotechnology*. Trends in Biotechnology. v.16(9), p.396-403. 1998.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. *Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments*. Biotechnology Advances. New York, v.26, p.457-470. 2008.

KAMBOUROVA, R.; DEREKOVA, A. *Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Amsterdam, v.22, p.307-313. 2003.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. *Industrial enzyme applications*. Current Opinion in Biotechnology. v.13, p.345-351. 2002.

KRISHNA, C. *Solid-state fermentation systems – an overview*. Crit. Rev. Biotechnol. v.25, p.1-3. 2005.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. *Statistical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes**. Brazilian Archives of Biology and Technology. v. 52(6), p.1349-1356. 2009.

- KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. *Biotechnol Adv.* v.17, p.561–94. 1999.
- LAUFENBERG, G. *Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. Bioresource Technology.* p.167-198. 2003.
- LEADLAY, P.F.; BAERGA-ORTIZ, A. *Mammalian fatty acid synthase: closure on a textbook mechanism?* *Chem. Biol.* v.10, p.101-103. 2003.
- LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. *Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of Bacillus subtilis 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme.* *Eur J Biochem.* v.216, p.155–160. 1993.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biocologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.* v.3, ed.1. Ed. Edgard Blücher Ltda. 2001.
- LIMA, A. S.; ALEGRE, R. M.; MEIRELLES, A. J. A. *Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems.* *Carboh. Polym.* v.50, p.63-68. 2002.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILIPPIS, I.; FONTANA, J. D. *Evaluation of the potencial for use in biocatalysis of lipase from a wild strain of Bacillus megaterium.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* Amsterdam, v.31, p.53-61. 2004.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. *Production, purification and characterization of an extracellular lipase from Aureobasidium pullulans HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils.* *Biochemical Engineering Journal.* v.40, p.445-451. 2008.
- LONGO, R. M.; ESPÍNDOLA, C. R. *Alterações em características químicas de solos da região amazônica pela introdução de pastagens.* *Acta Amazônica.* v.30, n.1. 2000.
- MALA, J. G. S.; TAKEUCHI, S. *Understanding structural features of microbial lipases – An overview.* *Analytical. Chemistry Insights.* Auckland, v.3, p.9-19. 2008.
- MUDGETT, R.E. *Solid State Fermentation* In: DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* Washington: American Society for Microbiology. p.66-84. 1986.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lenhinger: Princípios de Bioquímica.* 4 ed. São Paulo: Sarvier. 2007.
- ORIOU, E. *Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau.* Thèse de Doctorat Microbiologie, INSA Toulouse. p.113. 1987.
- PANDEY, A.; NIGAM P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. *Advances in microbial amylases.* *Biotechnol. Appl. Biochem.* v.31, p.135-152. 2000.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. *Enzyme Technology.* 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, p.760. 2005.

PARK, J.; CHO, S-Y.; CHOI, S-J. *Purification and characterization of hepatic lipase from Todarodes pacificus*. BMB reports. v.41(3), p.254-258. 2008.

PRIEST, F.G. *Extracellular enzymes*. Londres: Van Nostrand Reinhold. 1984.

RAO, M. B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v.62, p.597-635. 1998.

RASHID, N.; SHIMADA, Y.; EZAKI, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. *Low temperature lipase from psychrotrophic Pseudomonas sp. strain KB700A*. Appl Environ Microbiol. v.67, p.4064-4069. 2001.

ROMERO, F. J. et al. *Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from Serratia marcescens grown in whey*. Process Biochemistry. v.36, n.6, p.507-515. 2001.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. *Enzimas como agentes Biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.1-7. 2004.

SARADA, R.; JOSEPH, R. *Purification and properties of lipase from the anaerobe Propionibacterium acidipropionici*. Journal of the American Oil Chemists' Society. Chicago. v.69, p.974-977. 1992.

SARDA, L.; DESNUELLE, P.; *Biochim. Biophys. Acta*. v.30, p.513. 1958.

SCHIMID, A et al. *Industrial biocatalysis today and tomorrow*. Nature. v.409, p.258-268. 2001.

SINGH, M.; SINGH, S.; SINGH, R.S.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C *Transesterification of primary and secondary alcohols using Pseudomonas aeruginosa lipase*. Bioresource Technol. v.99, p.2116-2120. 2008.

SOCCOL, C.R. *Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique*. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion ET Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France. p218. 1992.

SPIER, M. R. *Produção de enzimas amilolíticas fúngicas amilase e amiloglicosidase por fermentação no estado sólido*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 2005.

WANG, X.; YU, X.; XU, Y. *Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from Burkholderia cepacia ATCC 25416*. Enzyme and Microbial Technology. v.45, p.94-102. 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. ed.2. Londres: John Wiley e Sons.1995.

VOGEL, H. J. *A convenient growth medium for Neurospora (Medium N)*. Microb. Genet. Bull., Columbus. v.13, p.42-43. 1956.

ZENG, J.; DU, W.; LIU, X.; LIU, D.; DAI, L. *Study on the effect of cultivation parameters and pretreatment on Rhizopus oryzae cell-catalyzed transesterification of vegetable oils for biodiesel production*. Journal of Molecular Catalysis: B – Enzymatic. Amsterdam. v.43, p.15-18. 2006.