UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

SAMILA SENA SILVA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* ATCC 1004 PRODUZIDA A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA

JEQUIÉ-BAHIA

OUTUBRO/2017

SAMILA SENA SILVA

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* ATCC 1004 PRODUZIDA A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte requisitos para obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior

JEQUIÉ-BAHIA

OUTUBRO/2017

S584p Silva, Samila Sena.

Produção, caracterização e aplicação de lipase de aspergillus ATCC 1004 produzida a partir do óleo de soja /Samila Sena Silva.- Jequié, 2017.

64f.: il.; 30cm.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, como requisitos para obtenção do título de Mestre (a) em Química, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Júnior.)

1.Lipase 2.Aspergillus niger 3.Prospecção tecnológica 4.Detergentes I.Vaslaques Junior, Gildomar Lima II.Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual Nº 9.996, de 02.05.2006
Programa de Pós-Graduação em Química

BAHIA GOVERNO DO ESTADO

Samila Sena Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM **27/10/2017.**

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior
(UFRJ, Rio de Janeiro-RJ, 2008)
(Orientador)

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior
(UEFS, Feira de Santana-BA, 2014)
(Coorientador)

Prof. Dr. Gesivaldo Santos
(UNICAMP, Campinas-SP, 2009)

Prof. Dr. Nívio Batista Santana
(UESC, Ilhéus-BA, 2017)

À minha avó Maria Magalhães (*in memorian).*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela realização de mais uma etapa.

Aos meus pais Solange e Valdir, pelo exemplo e apoio durante toda a minha vida.

Ao meu namorado Igor Lopes, pelo amor e companheirismo em todos os momentos.

A Naiara Dias, pela amizade e convívio durante essa caminhada.

Aos meus orientadores Prof Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Jr. e Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Jr. pelos ensinamentos, sugestões e incentivos durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Lisandro Diego Giraldez Alvarez pela colaboração na prospecção tecnológica.

Ao Prof. Dr. Marcelo Franco e o Laboratório Agroindustrial da UESC.

Aos colegas Polyana, Lucas, Luciana e Gleydson por terem me acolhido e ajudado nos experimentos realizados na UESC.

Aos Laboratórios de Farmacotécnica, Alimentos e Farmacodinâmica

Ao Prof. Dr. Mário pela instrução em diversos momentos, e a Profª. Drª. Marina Menezes pela utilização de equipamentos e por ter sido a primeira pessoa a me apresentar ao fantástico mundo das enzimas.

A minha turma de mestrado de 2015, e aos meus amigos de laboratório Romario, Eliane, Antônio, Alexsandra, Dhiéssica, Tatyana, Matheus Rocha e Maísla pela convivência e ajuda no decorrer dessa caminhada.

A UESB e ao programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade.

A banca examinadora pelo aceite do convite e contribuições ao trabalho.

A CAPES pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos,

ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank A. Clark

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 1004 PRODUZIDA A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA

Autora: Samila Sena Silva

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

RESUMO: As lipases fúngicas tem sido alvo de investigações devido às suas versáteis aplicações em diferentes setores industriais. O objetivo deste trabalho foi purificar, caracterizar e aplicar uma lipase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 1004 produzida a partir de óleo de soja como aditivo em formulações para outros detergentes comerciais. As condições experimentais ótimas para a produção da lipase foram estabelecidas utilizando um planejamento Doehlert. Os resultados mostraram que as melhores condições de produção foram no tempo de 120 hs de fermentação, temperatura de 30 °C e concentração de indutor de 3%. A variável resposta foi a atividade específica da lipase de 0,32 UA/mg. As melhores condições para determinação da atividade enzimática foram em pH 7,0 e temperatura de 40 °C. A lipase apresentou diminuição de atividade nas temperaturas acima de 40 °C com atividade residual de 25% a partir de 30 min. Os valores encontrados para as constantes cinéticas foram K_m 36,14 mM e $V_{máx}$ 6,53 U.min^{-1}. A influência de inibidores foi estudada, e como resposta, o ácido cítrico e o ácido ascórbico ocasionaram maior inibição na atividade da enzima. A imobilização com sílica apresentou um aumento de mais de 70% na atividade da lipase em relação à enzima livre. A purificação foi realizada em coluna contendo gel shepadex G-100. As frações eluídas de maior atividade enzimática foram liofilizadas e analisadas por eletroforese, sendo encontrado uma massa molecular de 36 kDa. Uma prospecção tecnológica de patentes sobre o uso de lipases em formulações para detergentes foi realizada para direcionar uma aplicação para a lipase isolada. A adição da enzima potencializou o desempenho de um detergente em pó comercial na remoção de manchas de óleos nos tecidos.

Palavras-chave: Lipase, *Aspergillus niger*, Prospecção tecnológica, Detergentes.

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF ASPERGILLUS NIGER LIPASE ATCC 1004 PRODUCED FROM SOYBEAN OIL

Autora: Samila Sena Silva

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio B. do Nascimento Junior

Coorientador: Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior

ABSTRACT: Fungal lipases have been investigated due to their versatile applications in different industrial sectors. The objective of this work was to purify, characterize and apply a lipase produced by *Aspergillus niger* ATCC 1004 produced from soybean oil as an additive in formulations for other commercial detergents. The optimum experimental conditions for lipase production were established using a Doehlert design. The results showed that the best production conditions were at 120 h of fermentation, temperature of 30 °C and concentration of inductor of 3%. The response variable was lipase-specific activity of 0.32 AU/mg. The best conditions to determine the enzymatic activity were at pH 7.0 and 40 °C. Lipase showed decreased activity at temperatures above 40 °C with residual activity of 25% from 30 min. The values found for the kinetic constants were *Km* 36.14 mM and V_{max} 6.53 U.min^{-1}. The influence of inhibitors was studied, and in response, citric acid and ascorbic acid caused greater inhibition in enzyme activity. The immobilization with silica showed a 70% increase in lipase activity in relation to the free enzyme. Purification was performed on a shepadex G-100 gel-containing column. The eluted fractions of higher enzymatic activity were lyophilized and analyzed by electrophoresis, and a molecular mass of 36 kDa was found. A technological patent prospect on the use of lipases in formulations for detergents was performed to direct an application to the isolated lipase. The addition of the enzyme potentiated the performance of a commercial laundry detergent in the removal of oil stains in tissues.

Key words: Lipase, *Aspergillus niger*, Technological prospecting, Detergents.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases 7

Figura 2.2: Reação do P-4-palmitato de nitrofenila (p-NPP) em água catalisada ela enzima lipase 8

Figura 2.3: *Aspergillus niger* em microfotografia e Colônia com 4 dias de incubação 9

Figura 2.4- Métodos de imobilização de enzimas em suportes: (a) adosorção; (b) ligação covalente; (c) quelação; (d) encapsulação 15

CAPITULO III

Figura 3.1. Distribuição de patentes depositadas por país 23

Figura 3.2. Evolução anual de depósitos de patentes envolvendo lipases para produção de detergentes na base WIPO 24

Figura 3.3. Principais requerentes dos depósitos de patentes relacionados a produção de detergentes utilizando lipase 25

CAPITULO IV

Figura 4.1: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: tempo e % de indutor, empregadas na otimização da produção enzimática 38

Figura 4.2: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: temperatura e % de indutor, empregadas na otimização da produção enzimática 38

Figura 4.3: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: temperatura e tempo, empregadas na otimização da produção enzimática 39

Figura 4.4- Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas (concentração de indutor, temperatura e tempo) na otimização da produção de lípase 39

Figura 4.5- Superfície de resposta e curva de nível geradas para as variáveis: pH e temperatura, empregadas na otimização da produção enzimática 42

Figura 4.6- Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas (concentração de indutor, temperatura e tempo) na otimização da produção de lipase 42
Figura 4.7- Atividade específica para a lipase 44
Figura 4.8 – Análise da adsorção da lipase de ATCC 1004 por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE) 45
Figura 4.9- Gráfico Lineaver-Burk para a lipase de *Aspergillus niger* 46
Figura 4.10- Efeito da temperatura na atividade da lipase obtida de *Aspergillus niger* 47
Figura 4.11-Remoção de manchas de tecidos sujos com óleo de motor residual utilizando diferentes condições de lavagem a 40ºC 49

LISTA DE TABELA

CAPITULO II

Tabela 2.1. Microrganismos produtores de lipase 10

CAPITULO III

Tabela 3.1. Principais classes da CIP verificadas na Classificação Internacional de Patentes 22

CAPITULO IV

Tabela 4.1- Matriz Doehlert para três variáveis na otimização da produção da lipase 37

Tabela 4.2 -Análise de Variância para o modelo quadrático usando resposta global 40

Tabela 4.3: Matriz para duas variáveis na otimização da atividade da lipase 41

Tabela 4.4 -Análise de Variância para o modelo quadrático usando resposta global 43

Tabela 4.5- Resultados obtidos na determinação da atividade, proteína total e atividade específica da lipase nos extratos 43

Tabela 4.6- Efeito de alguns íons na atividade da lipase 48

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

A.E. : Atividade Específica

BSA: Albumina de Soro Bovino

C.I.P.: Classificação Internacional De Patentes

E.B.: Extrato Bruto

E.I.: Extrato Imobilizado

E.P.P.: Extrato Parcialmente Purificado

E.P.: Extrato Purificado

EPO: European Patent Office

FP: Fator De Purificação

KDA: Kilo Dalton

P.D.A.: Potato Dextrose Agar

P-NPP: P-4-Palmitato De Nitrofenila

UA: Unidades De Absorbancia

WIPO: World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 1

1.1 INTRODUÇÃO 1

1.2 REFERÊNCIAS 4

CAPÍTULO II 6

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO 6

2.1 Aspectos Gerais sobre as Lipases 6

2.2 Produção de lipases por microrganismos 8

2.3 Processos Fermentativos para a Produção de Lipases 11

2.4 Aplicações de Lipases 12

2.5 Imobilização Enzimática 13

2.6 Métodos de Purificação Enzimática 15

2.7 REFERÊNCIAS 17

CAPÍTULO III 20

3.0 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES SOBRE O USO DE LIPASES EM FORMULAÇÕES DE DETERGENTES 20

CAPÍTULO IV 28

4.1 PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* ATCC 1004 PRODUZIDA A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA 28

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS 50

4.3 REFERENCIAS 51

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

Enzimas lipolíticas provenientes de microrganismos apresentam um grande valor para aplicação biotecnológica, devido principalmente a versatilidade de suas propriedades e facilidade de produção em grande escala, sendo um dos grupos mais utilizados no setor industrial (Miletic *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos compõem o grupo microbiano com maior número de espécies e apresentam imensa variedade quanto à morfologia e quanto aos atributos fisiológicos e bioquímicos. Essa diversidade tem propiciado ao homem explorar racionalmente algumas linhagens fúngicas que, sob condições adequadas e controladas, sejam capazes de produzir substâncias ou capazes de provocar alterações desejáveis em outras, resultando em produtos ou processos comerciais. Os fungos têm sido reconhecidos como as melhores fontes de lipases e, ultimamente, várias patentes envolvendo aplicação de lipases fúngicas têm sido requeridas (Farinas e Barbosa, 2012).

Muitos microrganismos são conhecidos por produzir diferentes tipos de lipases de acordo com as condições de cultivo tais como pH, composição do meio de cultura, temperatura e tempo de cultivo, além da ação da enzima em relação à especificidade do substrato (Gonçalves, 2007).

De acordo com Sharma et al. (2001), entre os fungos produtores de lipase, os gêneros mais citados são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium*. Considerando o expressivo uso da espécie *Aspergillus níger* na produção de lipases com bom rendimento de produção, fácil manutenção e possibilidade de cultivo sob condições controladas de laboratório, o *Aspergillus níger* ATCC 1004 foi escolhido para ser o produtor de lipase neste presente trabalho.

Lipases (E.C. 3.1.1.3) são um grupo vital de enzimas ubíquas que catalisam a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa em glicerol e ácidos graxos na interface de lipídios e água (Shangguan *et. al*., 2011 e Hassan *et. al*., 2006).

Outra característica marcante das lipases é a sua ativação na presença de interfaces hidrofóbicas (micelas de substrato, solventes orgânicos

imiscíveis, etc.). Na ausência de interfaces, o sítio ativo das lipases é frequentemente coberto por uma “tampa”, um oligopeptídeo hidrofóbico, tornando-o inacessível ao substrato. Entretanto, na presença de interfaces hidrofóbicas a estrutura tridimensional da lipase é rearranjada, levando à abertura da “tampa”. Essas mudanças conformacionais expõem superfícies hidrofóbicas da enzima que podem interagir com interfaces hidrofóbicas, conferindo funcionalidade à enzima (Vescosi, 2012).

Nos últimos tempos, as lipases fúngicas foram submetidas a uma investigação devido às suas versáteis aplicações em diferentes setores industriais. Sendo amplamente utilizados em alimentos, medicamentos, biotecnologia, detergentes, têxteis, surfactantes e hidrólise de gorduras (Colleg, *et. al*., 2015).

Porém, as lipases são enzimas de alto custo, sendo este um aspecto crítico na implementação de processos enzimáticos. Uma alternativa que poderia levar à diminuição no custo de produção da enzima seria a utilização de técnicas simples de purificação, uma vez que esta etapa do processo acarreta em grande parte o custo da enzima. Outro inconveniente que impede o uso massivo de lipases, e enzimas em geral, está relacionado com sua forma solúvel, na qual muitas enzimas não são suficientemente estáveis, podendo perder sua atividade catalítica. Estes problemas podem ser solucionados através de técnicas de imobilização de enzimas, na qual a enzima passa a ser um catalisador heterogêneo, tornando as reações catalisadas por enzimas imobilizadas potencialmente competitivas econômicas e ambientalmente corretas, frente o uso de catalisadores químicos (Assis *et. al*., 2015; Colla *et. al*., 2016; Mendes *et. al*., 2012).

Além disso, um campo de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes de uso doméstico e industrial, sendo vista como uma potencial alternativa para o melhoramento no processo de remoção de manchas nos tecidos, diminuindo assim a utilização de substâncias químicas removedoras de manchas e contribuindo para uma química mais limpa com substâncias biodegradáveis sendo despejadas na natureza (Hemlata *et. al*., 2016).

Diante de tal contexto e considerando a relevância do estudo este trabalho de pesquisa buscou investigar a influência de variáveis que atuam na atividade catalítica da lipase e sua ação em conjunto com detergentes de uso doméstico frente à remoção de manchas de óleo. Assim, o objetivo do trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar uma lipase produzida por *Aspergillus niger* ATCC 1004 produzida a partir de óleo de soja como aditivo em formulações para outros detergentes comerciais.

1.2 REFERÊNCIAS

ASSIS, A.H.C.; MUNARO, M. Melhoria no processo de tingimento de fibras de poliéster após hidrólise por enzima lipase. **Revista Evidência** (2015) pp. 113-128.

COLLA, M. L.; PRIMAZ, L.A.; BENEDETTI, S.; LOSS, A.R.; LIMA, M.; REINEHR, S.; BERTOLIN, E.T.; COSTA, V.A.J. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** (2016) pp. 461-467.

COLLEG, V.D.G.; CHENNAI; ARUMBAKKAM; TAMILNADU; INDIA. Isolation and screening of lípase producing microorganism from soild and comparative study of enzyme activity with different substrates. **International Journal of Scientific Engineering and Technology Research** (2015), pp. 5778-5781.

FARINAS C. S.; BARBOSA, C. D. Fungos filamentosos de interesse em agroenergia: avaliação de diferentes metodologias de preservação do fungo *Aspergillus niger*. São Carlos: Embrapa Instrumentação (2012). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 37; ISSN: 1678-0434.

GONÇALVES, G. A. F. Produção de lipase extracelular por levedura em cultivo submerso. 2007. 67 p. Dissertação (Mestrado) - **Faculdade de Farmácia da UFMG**, Belo Horizonte, 2007.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lípases**. Enzymeand Microbial Technology** (2006), pp. 235–251.

HEMLATA, B.; UZMA, Z.; TUKARAM, K. Substrate kinetics of tiol activated hyperthermostable alkaline lípase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in bio-detergent formulation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (2016), pp.104-111.

MENDES, A. A. *et al*. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

MILETIC, N., VUKOVI, Z., NASTASOVI, A., LOSS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v.115, p. 126-135, 2012.

SHANGGUAN, J.; LIU, Y-Q.; WANG, F-J.; ZHAO, J.; FAN, S-X.; XU, JH. Expression and Characterization of a Novel Lipase from *Aspergillus fumigates* with High Specific Activity. **Appl Biochem Biotechnol** (2011) 165:949–962.

SHARMA, R.; CHISTI,Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances** (2001) pp. 627–662.

VESCOSI, V. Extração, purificação e imobilização de lípases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. 2012. 93 p. Dissertação (Mestrado) – **Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos – SP, 2012.

CAPÍTULO II

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1ASPECTOS GERAIS SOBRE A LIPASE

As lipases (triacilglicéridos hidrolases, EC 3.1.1.3) são uma família de enzimas que, em condições naturais, catalisam a hidrólise de ligações éster carboxílico em compostos hidrofóbicos tais como triglicéridos (Schreier, 1997). Sendo amplamente encontradas na natureza, as lipases podem ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (Castro *et. al*., 2014).

Entretanto, somente as lipases microbianas são comercialmente utilizadas, devido à versatilidade de suas propriedades, à fácil produção em massa, diversidade nas propriedades enzimáticas e especificidade do substrato, o que as torna muito atrativas para a aplicação industrial (Roveda *et. al.*, 2010).

Embora a função metabólica das lipases seja catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos ácidos graxos correspondentes e glicerol sob condições micro aquosas, elas também são capazes de catalisar a síntese de ésteres. Uma combinação destes dois processos básicos em sequências lógicas pode resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação, a depender dos reagentes de partida), como apresentado na Figura 2.1. Além disso, elas também são capazes de catalisar aminólise e tiotransesterificação (Brígida, 2010).

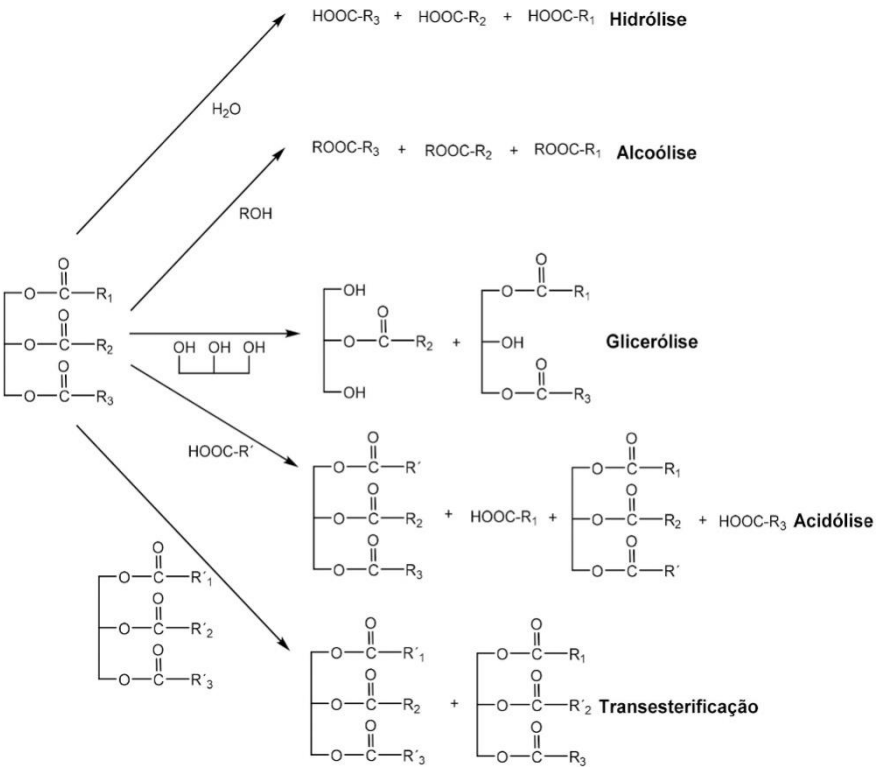

Figura 2.1. Reações catalisadas por lipases. Fonte: (CASTRO *et. al.*, 2014)

As lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente. A maioria das lipases apresenta atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C. Sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et. al*., 2014).

A atividade de lipase tem sido determinada através da quantificação dos ácidos graxos liberados durante a hidrólise mediada pela enzima. Estes produtos podem ser determinados por métodos físico-químicos avaliando-se o desaparecimento do substrato ou a formação dos produtos da reação. Dentre os vários métodos disponíveis para acompanhar a atividade de lipase presente no meio fermentativo, os mais utilizados são os colorimétricos que utilizam substratos sintéticos como ésteres de ácidos graxos de p-nitrofenila (acetato, butirato, caproato, caprato, palmitato e esterato (Messias *et. al.,* 2011).

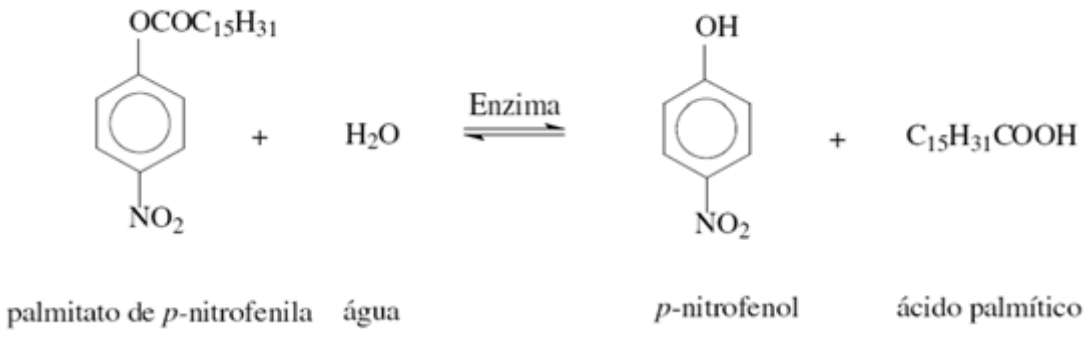

Figura 2.2: Reação do P-4-palmitato de nitrofenila (p-NPP) em água catalisada ela enzima lipase. Fonte: (CASTRO *et. al.*, 2014)

2.2 PRODUÇÃO DE LIPASES POR MICRORGANISMOS

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos podem crescer em substratos sólidos e líquidos. Contudo, são os fungos filamentosos os microrganismos mais adaptáveis a este tipo de processo (Amorin, 2011).

Os fungos filamentosos são ideais para produção de substâncias de interesse biotecnológico, possuindo crescimento rápido e baixo custo de cultivo sob condições controladas em laboratório. A denominação fungos filamentosos abrange os fungos formados por hifas, uni ou pluricelulares, que formam revestimentos esbranquiçados ou coloridos, sobre o substrato (Santos, 2013).

Os microrganismos são amplamente reconhecidos por serem as melhores fontes de lipases, com várias patentes depositadas em diversas áreas de aplicações tendo sido desenvolvidas. Assim, um grande número de lipases de fungos filamentosos tem sido extensivamente estudado sob pontos de vista genéticos e bioquímicos (Collen, 2006).

A escolha do microrganismo adequado é importante no sucesso da produção desejada. O *Aspergillus niger*, por exemplo (Figura 2.3), tem a capacidade de produzir 19 tipos diferentes de enzimas, dependendo da indução e/ou do substrato. As espécies que compõe o gênero têm ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar e na água, tanto em organismos vegetais bem como em animais, além de estarem associadas com

a deterioração de materiais vegetais e alimentos, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (Amorin, 2010).

(A) (B)

Figura 2.3: *Aspergillus niger* em microfotografia (A) e Colônia com 4 dias de incubação (B). Fonte: Atlas Micologia, 2011.

Em escala industrial, as lipases progênitas de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são as mais utilizadas devido as facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além do seu baixo custo de obtenção; são geralmente mais estáveis e com propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (Roveda *et. al*., 2010).

Lipases extracelulares são secretadas em quantidades significativas por algumas espécies de fungos filamentosos, quando estes são cultivados em condições apropriadas, e são facilmente separadas da massa micelial por filtração ou centrifugação. Apenas pequena quantidade de lipases tem sido encontrada dentro ou aderida ao micélio (Messias *et. al*., 2011).

Uma grande variedade de microrganismos tem a habilidade de produzir lipases, sendo função de alguns parâmetros reacionais. Através da Tabela 2.1 é possível observar alguns microrganismos produtores de lipase relatados pela literatura.

Tabela 2.1. Microrganismos produtores de lipase.

Microrganismo	Referência
Aspergillus niger	JIA JIA *et. al.,*2015
Aspergillus flavus	COLLA *et. al.,*2016
Candida rugosa	ZHANG *et. al.,* 2016
Fusarium graminearum	NGUYEN *et. al.,* 2010
Mucor circinelloides	CARVALHO *et. al.,* 2015
Mucor racemosus	MOHAMED *et. al.,* 2011
Nomuraea rileyi	*MJ*WIWAT *et. al.,* 2010
Penicillium sp	DHEEMAN *et. al.,* 2011
Penicillium chrysogenum	KUMAR *et. al.,* 2012
Rhizopus oryzae	LI *et. al.,* 2015
Trichoderma	COLLA *et. al.,*2010
Yarrowia lipolytica	DARVISHI *et. al.,* 2011

A produção de lipases por microrganismos como fungos é grandemente determinada por variáveis nutricionais e físico–químicos como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, presença de lipídeos, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, variáveis compartilhadas na influência da produção com leveduras (Singh *et. a.l*, 2012).

Sabe–se que os indutores extracelulares são responsáveis por ativar a produção das lipases, em geral são substâncias com longa cadeia carbônica na sua estrutura química: óleos, gorduras animais, tween, etc, que também são fontes de carbono para os microrganismos. Essas moléculas são assimiladas e estocadas quando, depois, a lipase é produzida e excretada para a interface óleo–água no meio extracelular. A modulação da produção de lipase é feita muitas vezes pela concentração do indutor no meio extracelular (Gomide, 2012).

Com relação às fontes de carbono, em geral os lipídeos, ésteres hidrolisáveis, sais biliares e glicerol induzem a produção de lipase em os

microrganismos (Singh *et. al*, 2012). A presença de óleos ou de substâncias com longa cadeia carbônica é quase sempre necessária para promover a produção da enzima. Quando a fonte oleosa não se encontra presente no meio de cultura de cultivo do microrganismo a síntese da lipase é sensivelmente decrescida para várias espécies e meios testados (Wu *et. al*., 2015), muito embora a produção basal das mesmas seja detectável em muitos microrganismos. Independentemente do modo de produção, induzida ou não, ela acontece determinada pelo mesmo gene (Singh *et. al.,*2012).

Em relação às fontes de nitrogênio que mais influenciam o cultivo de microrganismos para produção dessa proteína lipolítica, nota–se a utilização recorrente de peptona (1,0 – 5,0%) e (ou) extrato de levedura (0,1 – 1,0%) nos meios de cultura. Em geral elas são mais efetivas para produzir lipase quando se comparam elas com fontes inorgânicas de nitrogênio (Jia Jia *et. al.,*2015; Gomide, 2012).

As diferentes fontes de íons metálicos também podem produzir efeitos significativos na estimulação da produção de lipase por diversos microrganismos quando comparadas entre si. Na revisão de (Sharma *et al.,* 2001), foi percebido consenso em muitos dos trabalhos reportados sobre o aumento da produção de lipase na presença de Mg^{2+} no meio de cultura. Com menor frequência, também foi relatada, a influência da presença de Ca^{2+} no aumento da produção (Kumar *et. al.,* 2012; Roveda, 2010).

2.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE LIPASES

Diferentes técnicas de produção de lipase têm sido desenvolvidas para melhorar a produção da enzima. Dentre as mais comuns encontram–se a fermentação em estado sólido, que distribui os componentes nutricionais para o crescimento do microrganismo em meio gelatinoso e a fermentação submersa onde os nutrientes estão dissolvidos no meio (Gomide, 2012).

A fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros do processo. É a técnica majoritariamente utilizada nos países

ocidentais para a produção de enzimas devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas (Roveda *et. al.,* 2010). Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e o desenvolvimento do microrganismo se dá em presença de água livre. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (Orlandelli *et. al*., 2012).

Na fermentação submersa, além de um melhor controle em geral do processo (pH, temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato), e a possibilidade da recuperação de enzimas extracelulares, a determinação da biomassa e consequentemente cinética de crescimento é facilitada. A amostra, pode ser utilizada para determinação das células viáveis totais, e o sobrenadante utilizado para a identificação da atividade enzimática (Wanderley *et. al.,* 2011)

Além dos pontos já citados, a fermentação submersa quando comparada com a fermentação no estado sólido, oferece as seguintes vantagens (Wanderley *et. al.,* 2011):

- Facilidade no controle de grandes volumes;
- Os microrganismos são submetidos às mesmas condições (homogeneidade) físico-químicas, e principalmente o acesso aos nutrientes, facilitando a identificação dos parâmetros ideais de produção;
- A absorção de nutrientes e excreção de metabólitos é executada com maior eficiência e, consequentemente, maior produtividade;
- Viabilidade econômica de produtos limitados, tais como: álcool etílico, bebidas alcóolicas, antibióticos, vitaminas, enzimas, insulina, etc.

2.4 APLICAÇÕES DE LIPASES

O uso de enzimas nas indústrias possibilita o desenvolvimento de processos tecnológicos tão eficientes quanto aos realizados pela natureza e sem causar riscos ambientais. Depois das proteases e carboidrases, as lipases constituem o terceiro maior grupo de enzimas em vendas no mundo (Messias*, et. al.,* 2011 e Castro, *et.al*., 2014).

As versatilidades das lipases fazem com que estas possuam um vasto potencial de aplicação em indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosmética e indústria papeleira. Além disso, a utilização de lipases pelas indústrias apresenta vantagens como: estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, facilidade de separação dos produtos e, quando imobilizadas, podem ser submetidas às condições industriais típicas (Amorin, 2011).

Embora as lipases sejam produzidas por vegetais, animais e microrganismos, os fungos são valorizados porque produzem enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação destas do meio fermentativo. As fontes fúngicas têm sido preferenciais, não só devido às suas melhores características em relação à lipases bacterianas, mas porque, na sua maioria, não são nocivas à saúde humana e reconhecidas como GRAS (Generally Regarded As Safe –Geralmente Reconhecido como Segura) (Messias *et. al.,* 2011).

Dentre as enzimas, as lipases são muito utilizadas, em virtude da ampla gama de reações que podem catalisar, sendo aplicáveis em uma diversidade de setores industriais, em especial na indústria de detergentes; no tratamento de efluentes; para o desenvolvimento de cosméticos, compondo medicamentos, como reagentes clínicos na biotecnologia, na indústria de alimentos, etc. (Colla *et. al.* 2012; Xiao-Lu, L. *et. al.,* 2014; Marion e Thum 2013; Zhang, R. *et. al*., 2016; Darvishi, F*. et. al*., 2011; Meng, Y. *et. al.,* 2015)

Apesar do grande número de lipases fúngicas estarem descritas na literatura, somente as enzimas de poucas espécies têm demonstrado possuir a estabilidade adequada e capacidade satisfatória de biocatálise para serem empregadas em reações de síntese nos laboratórios e, assim, serem consideradas de relevância à aplicação industrial (Junior *et. al.,* 2016).

2.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

De um modo geral, as enzimas estão sujeitas à inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, podendo ocorrer quando estocadas ou durante sua aplicação. Para que a catálise seja eficiente em um determinado processo, há necessidade de proteger as enzimas da interação com o solvente, pois o

mesmo poderia provocar a inativação, impossibilitando a catálise da reação. Frente a este problema, a técnica da imobilização é utilizada para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar sua recuperação e reutilização (Villeneuve *et. al.,* 2000).

Enzimas imobilizadas são aquelas que se encontram ligadas covalentemente ou não em um suporte que possa proteger a capacidade catalítica da enzima (Brígida, 2006). O processo de imobilização consiste em circundar o material com atividade biológica em uma matriz polimérica envolvida por uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de nutrientes, oxigênio e protegem de perdas internas da célula de ambos, *stress* mecânico e compostos tóxicos (Colleg, 2015).

A imobilização de enzimas tem um importante papel dentro da biotecnologia aplicada, pois sua utilização como biocatalizadores está normalmente limitada pela falta de estabilidade nas condições operacionais do processo, e também pela dificuldade de recuperar e reciclar o biocatalizador. Portanto, a enzima necessita ser altamente estável ou tornar-se altamente estabilizada durante a imobilização para ser aplicada a um processo industrial (Mateo *et. al.*, 2007; Junior *et. al*., 2016).

Uma vez que a enzima esteja imobilizada, ou adsorvida a um suporte, passa ser um catalisador solúvel a apresentar as seguintes vantagens como:

- Reutilização ou uso contínuo.
- Fácil separação da mistura de reação.
- Possibilidade de modular as propriedades catalíticas.
- Prevenção de uma contaminação microbiana.
- Possível estabilização da estrutura tridimensional da enzima.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e desativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. Os principais métodos de imobilização são: adsorção, ligação covalente, quelação e encapsulação, conforme Figura 2.4 (Colleg, 2015).

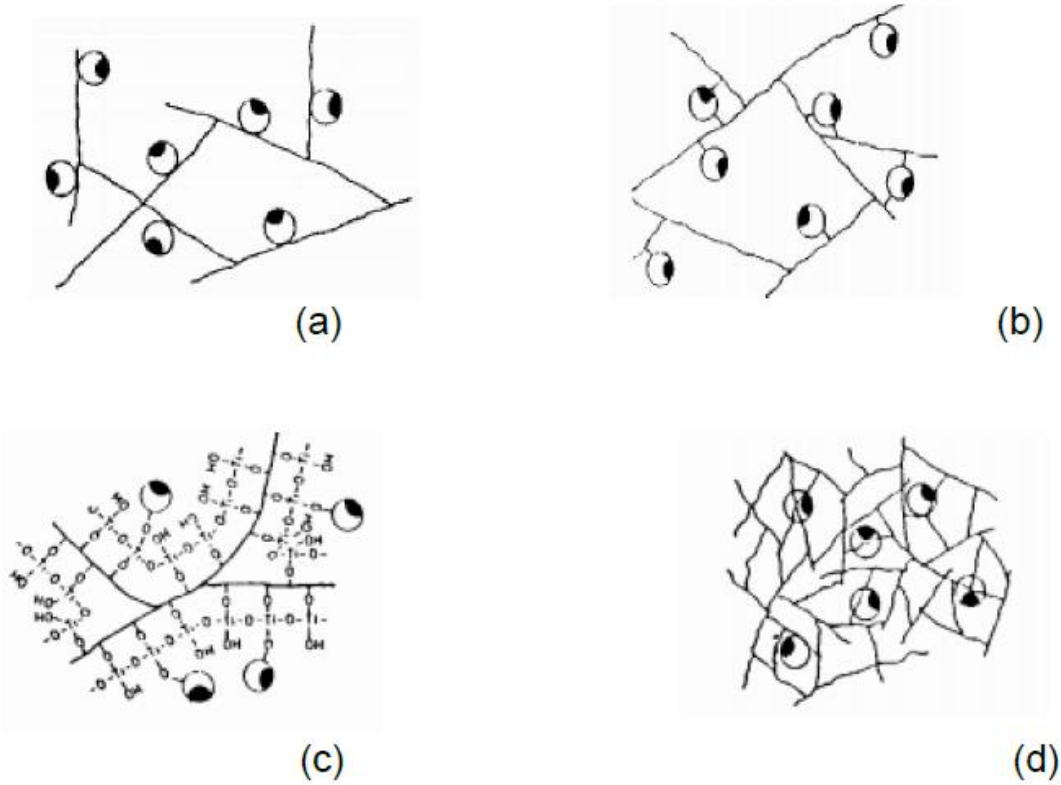

Figura 2.4- Métodos de imobilização de enzimas em suportes: (a) adosorção; (b) ligação covalente; (c) quelação; (d) encapsulação. Fonte: (Ferraz, 2014)

Dentre todos os métodos de imobilização, a adsorção ainda é o mais utilizado, devido à grande porção hidrofóbica das lipases, à facilidade e simplicidade na metodologia, e por ser economicamente mais barato e menos agressivo em relação à atividade enzimática (Baron, 2008).

2.6 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas são encontradas na natureza em misturas complexas. Geralmente as células apresentam centenas ou mais diferentes enzimas, para um estudo aprofundado deve-se purificar a enzima a ser estudada. Em alguns casos é possível através da aplicação de métodos específicos utilizar enzimas no estado impuro, mas na maioria dos casos, a presença de outras enzimas interfere nos substratos desviando as reações específicas (Alvarez *et. al*., 1994).

A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza, portanto a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e

moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima (Bassani *et al.,* 2010).

O processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de pureza. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima (Selvakumar *et al.*, 2010).

De forma geral, as enzimas podem ser purificadas por etapa única (por exemplo, cromatografia de afinidade) ou por uma combinação de várias etapas (por exemplo, precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, etc.). A precipitação é descrita como uma tecnologia bastante simples, que pode ser utilizada para remover impurezas ou isolar uma proteína alvo numa mistura. Dentre as técnicas de precipitação a utilização de sulfato de amônio é a mais utilizada devido à precipitação da maioria das proteínas ocorrer em uma molaridade alta, não promover o aquecimento da solução (em comparação com a utilização de solventes como etanol), apresentar uma densidade que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas e promover o efeito de concentração das proteínas (Kanwar *et al.,* 2006; Contesini *et. al*., 2010; Ulker *et. al*., 2012).

2.7 REFERENCIAS

ALVAREZ, F.E. Detergentes Enzimáticos. Porto Alegre, p-15. 1994.

AMORIN, G. M. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. [dissertação de mestrado]. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2011.**

BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. Coll. **Surf. B: Biointerf**. 75p. 532–537, 2010.

BRÍGIDA, S. I. A. Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais. [tese de doutorado] **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2010.

CASTRO, H. F. *et. al.* Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2014.

COLLA, M. L.; REINEHR, O. C.; COSTA, V. A. J. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC**, Rio Grande do Sul, v. 4, n. 2, p. 1-14, 2012.

COLLEG, V.D.G.; CHENNAI; ARUMBAKKAM; TAMILNADU; INDIA. Isolation and screening of lípase producing microorganism from soild and comparative study of enzyme activity with different substrates. **International Journal of Scientific Engineering and Technology Research** (2015) pp. 5778-5781.

COLLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. [dissertação de mestrado]. **Faculdade de Farmácia**- UFMG, Belo Horizonte, 2006.

CONTESINI, J. F.; LOPES, B.D.; MACEDO, A.G.; NASCIMENTO, G.M.; CARVALHO, O. P. *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 67, p. 163-171, 2010.

DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. High-level production of extracellular lípase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleat. **New Biotechnology** (2011) pp. 756-760.

FERRAZ, R.I.L. Aplicação de lípases na catálise de reações de interesse. Erechim: 2014. [tese de Doutorado]. Departamento de ciências Agrárias, **Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões**.

GOMIDE, F.T.F. Otimização de produção, purificação e caracterização parcial de lípases produzidas pela levedura *Moniliellas pathulata* R25L27. [dissertação de mestrado]. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2012.

JÚNIOR, M.G.W.; KAMIMURA, S.E.; RIBEIRO, J.E.; PESSELA, C.B.; CARDOSO, L.V.; RESENDE, M.M. Optimization of the production and

characterization of lípase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification** (2016) pp. 26-34.

KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R.K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metallo lipase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 421-428, 2006.

MARION B., ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, O. Immobilised lípases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviwes** 2013.

MATEO, C. *et. al.,* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques**. Enzyme Microb Technol** 2007, n. 40, p. 1451-1463.

MENDES, A. A. e*t. al.* Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 296-305, 2005.

MENG, Y. *et. al.* Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of chinese food waste. **Bioresource Technology** (2015) pp.452-459.

MESSIAS, M. J. *et. al.,* Lipases microbianas: produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 32, n. 2, p.213-234, 2011.

ROVEDA, M. *et. al.* Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SANTOS, C. T. Fermentação em estado sólido do farelo de palma forrageira: obtenção de enzimas industriais e enriquecimento protéico para utilização na alimentação de ruminantes. [dissertação de mestrado] **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**, Itapetinga, 2013.

SCHREIER, P. In Biotechnology of aroma compounds, ed. R. G. Berger, Springer, Berlin, **Heidelberg, New York, 1997, pp. 51–72.**

SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, 2010.

SHARMA, R. et al. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances** (2001) pp. 627–662.

SINGH, K. *et. al.* Characterization of a thermostable lipases howingloss of secondary structure at ambient temperature. **Molecular biologyreports**. V. 39, n. 3, p. 2795-2804, 2012.

ORLANDELLI, C.R. *et. al.* Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. de Saúde e Biol**. v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

ULKER, S.; KARAOGLU, A.S. Purification and characterization of na extracellular lipase from *Mucorhiemalis* f. *cortícola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, p. 385-390, 2012.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J.M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***.* 2000; 9:113-148.

WANDERLEY, D.M *et. al.* Aspectos da produção industrial de enzimas. **Ciência, tecnologia, inovação e oportunidade**. v. 1, n. 1, p. 44-50, 2011.

WU, D. *et. al*. Development and characterization of na enzymatic time-temperature indicator (TTI) based on *Aspergillus niger* lipase. LTW- Food **Science and Technology** (2015) pp. 1100-1104.

XIAO-LU, L.; ZHANG, W.H.; WANG, Y.D.; DAI, Y.J.; ZHANG, H.T.; WANG, Y.; WANG, H.K.; LU, F.P.A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. **Journal of Molecular Catalysis** (2014) pp. 16-24.

ZHANG, R.; ZHAO, L.; LIU, R. Deciphering the toxicity of bisphenol a to *Candida rugos a*lípase through spectrofotometric methods. **Jounal of Photochemistry & Photobiology** (2016) pp. 40-46.

CAPÍTULO III

3.0 PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES SOBRE O USO DE LIPASESEM FORMULAÇÕES DE DETERGENTES

Resumo

As Lipases são vistas como uma potencial alternativa para utilização em formulações para detergentes pois melhoram a capacidade destes de remover manchas difíceis, e tornando-os menos danosos ao meio ambiente. Assim, estas enzimas vêm ganhando espaço em pesquisas, sendo cada vez mais utilizadas pelas industriais do setor. O objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção tecnológica do uso de lipases em formulações para detergentes, analisando a participação dos países nos depósitos dessas patentes, os anos de depósitos e as empresas detentoras dessa tecnologia. Para isso, a prospecção foi realizada (efetuada) utilizando duas bases de dados de depósitos de patentes, o European Patent Office (EPO) e na World Intellectual Property Organization (WIPO). Os documentos foram analisados individualmente através do software gratuito Google Refine. Os resultados demonstraram que os Estados Unidos, Espanha e China aparecem como maiores depositantes, os maiores números de patentes foi depositado nos anos de 1989 e 1999, sendo que a maioria destes depósitos foram realizados por empresas privadas.

Palavras-chave: prospecção tecnológica, lipase, detergentes.

INTRODUÇÃO

Entre as diversas enzimas aplicadas industrialmente destacam-se as lipases por sua alta especificidade na hidrólise de ligações éster de triglicerídeos. As lipases (triglicerolacil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases que agem sobre ligações ésteres presentes em acil gliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol; essa catálise ocorre sobre substrato insolúvel em água(Jia *et al*., 2015). Ocorre em animais (Zhao *et. al.,* 2014), plantas (Ahmad *et. al*.,2010) e microrganismos (Colla, *et. al*., 2016).

As lipases comercialmente úteis são usualmente obtidas a partir de microrganismos pois produzem uma grande variedade de lipases extracelulares, com elevada especificidade e estabilidade em suas reações,

permitindo assim ser muito atrativa para a indústria, servindo para aplicações em diversos segmentos industriais (Colleg, *et. al*., 2015).Dentre os fungos produtores de lipase, os gêneros mais citados são *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (Hasan *et al*., 2006).

As lipases fúngicas têm especial interesse devido à sua estabilidade em solventes orgânicos, sua falta de requisitos para cofatores, a sua ampla especificação de substrato e a elevada seletividade enantio. Nos últimos tempos, as lipases fúngicas foram submetidas a uma investigação devido às suas versáteis aplicações em diferentes setores industriais. Sendo amplamente utilizadas em alimentos, medicamentos (Zhang *et. al*., 2016), biotecnologia (Darvishi *et. al.,* 2011), detergentes (Xiao-Lu, *et. al*., 2014), surfactantes (Xiaolin *et. al*., 2013), hidrólise de gorduras (Ramani *et. al*., 2010), entre outras.

Um dos campos atualmente de maior aplicação industrial das lipases é a indústria de detergentes de uso doméstico e industrial. Aproximadamente 1000 toneladas de lipases são adicionadas em cerca de 13 bilhões de toneladas de detergentes produzidos a cada ano. (Colla, L.M. *et. al.,* 2012).

A utilização de lipases oriundas de resíduos agroindustriais como meio de cultivo dos microrganismos produtores vem aumentando por ser ambientalmente viável e diminuir os gastos de processos que os utilizam e faz com que estes detergentes sejam conhecidos como oriundos de uma “tecnologia limpa”, valorizando assim o produto (Kumar *et al.,* 2012; Salihu *et al*., 2012). Além disso, os detergentes enzimáticos representam cerca de 40% da produção mundial total de detergentes e, portanto, representam uma das maiores e mais bem sucedidas aplicações da biotecnologia industrial moderna (Hemlata *et. al.,* 2016).

Considerando o expressivo uso e potencial da lipase para a indústria de detergentes, o objetivo deste trabalho, foi realizar uma prospecção tecnológica de patentes sobre o uso de lipase em formulações de detergentes, como ponto de partida para direcionar uma futura aplicação de lipase isolada de *Aspergillus* niger.

METODOLOGIA

A prospecção foi realizada com base nos pedidos de patentes depositados no *European Patent Office* (EPO) e na *World Intellectual Property Organization* (WIPO).

A pesquisa foi realizada no mês de setembro de 2016, sendo utilizada como estratégia de busca o Código Internacional de Patentes (CIP) relacionado a composição de detergentes contendo enzimas, conforme Tabela 1. Todos os pedidos foram analisados individualmente através do software gratuito Google Refine®, considerando o ano de depósito, CIP e país de depósito.

Tabela 3.1 Principais classes da CIP verificadas na Classificação Internacional de Patentes.

Código da CIP	**Descrição**
C11D 3/386	Composições de detergentes - Preparações contendo enzimas.
C11D 7/42	Composições de detergentes baseadas essencialmente em compostos não tensoativos - Preparações contendo enzimas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Distribuição de patentes por países

A partir da estratégia definida anteriormente, foram encontrados138 (cento e trinta e oito) documentos de patentes, no entanto apenas 50 (cinquenta) estavam com informações descritivas detalhadas sobre as características dos detergentes.

Dentre as 50 (cinquenta) patentes de detergentes analisadas, 46 (quarenta e seis) continham em suas formulações a presença apenas de lipase, já nas 4 (quatro) restantes, a presença de um complexo multi-enzimático, envolvendo lipase-celulase-protease. Os detergentes de um modo

geral, destinavam–se a lavagem de todos os tipos de tecidos, objetivando o melhoramento do processo de remoção de sujeiras e manchas.

A Figura 3.1 demonstra que os Estados Unidos (US) é o principal país depositário com 50 patentes encontradas sobre a utilização de lipases para a produção de detergentes. Em seguida, as Patentes internacionais representando o segundo maior depósito, com 33 documentos, a Espanha (EP) com 16 patentes, e na sequência aparece a China (CN) com 8 patentes. Países como Japão com 7 patentes, México com 6, Nova Zelândia com 4 e Grã-Bretanha com 2também aparecem na pesquisa.

O Brasil não possui contribuição no depósito de patentes com os códigos utilizados, não se encontrando entre os países depositantes dessa tecnologia. Acredita-se que os pesquisadores brasileiros em geral, ainda não possuem o hábito de patentear suas pesquisas, sendo assim, preferem a publicação de suas pesquisas na forma de artigo científico em vez de proteger sua descoberta. Provavelmente isso pode estar associado a um certo desconhecimento da importância da proteção patentária como também a aspectos burocráticos que envolve o processo de registro de patente no País.

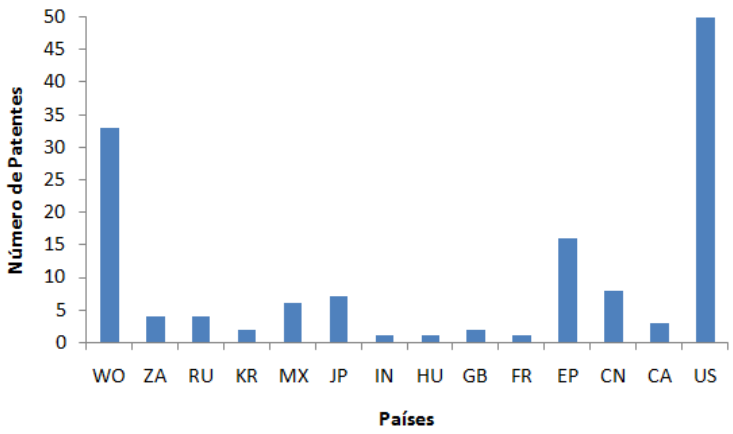

Figura 3.1. Distribuição de patentes depositadas por país, sendo WO (Patentes Internacionais), ZA (Nova Zelândia), RU (Rússia), KR (Coréia do Sul), MX (México), JP (Japão), IN (Índia), HU (Hungria), GB (Grã-Bretanha), FR (França), EP (Espanha), CN (China), CA (Canadá) e US (Estados Unidos).

Distribuição de patentes por ano de depósito e requerentes

Com o objetivo de verificar a evolução temporal nos pedidos de patentes, foram analisados os anos de depósitos. A pesquisa foi realizada entre os anos de 1972 a 2016.

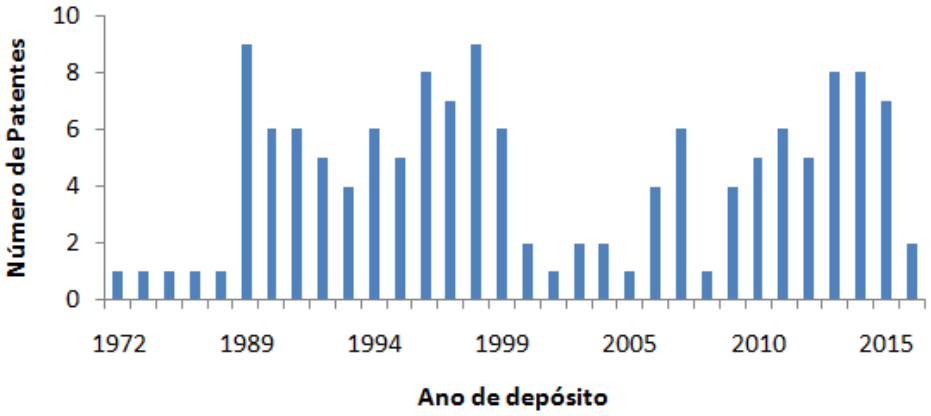

Figura 3.2. Evolução anual de depósitos de patentes envolvendo lipases para produção de detergentes na base WIPO.

Observamos pela Figura 3.2 que a partir do ano de 1989 houve um aumento no número de depósitos, esse aumento voltou a ser observado no ano de 1999, nos anos seguintes o ritmo diminuiu voltando a crescer em 2012.

Outro fator analisado, são as origens das empresas depositárias das patentes. São todas de capital privado, multinacionais, mundialmente conhecidas e localizadas em países como Estados Unidos, Espanha, Japão, e China como mostra a Figura 3.3.

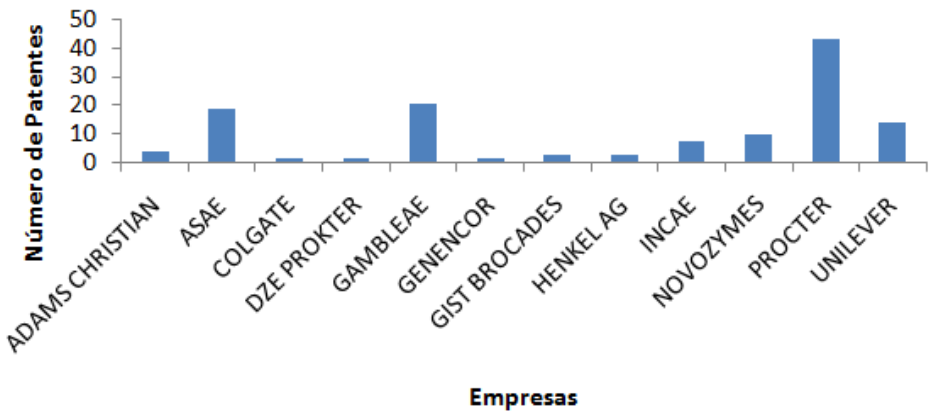

Figura 3.3. Principais requerentes dos depósitos de patentes relacionados a produção de detergentes utilizando lipase.

Todas as empresas listadas são dos mais variados ramos industriais. Seus produtos incluem alimentos, bebidas, higiene pessoal e produtos de limpeza, sendo a Unilever, Procter (P&G) e Colgate as mais conhecidas no Brasil.

De forma geral, o presente trabalho surge na premissa de abordar o estado das patentes relacionadas ao tema, além de se observar como os depositantes estão direcionando a produção de suas novas tecnologias. Vale destacar a dificuldade no levantamento desses dados, já que a maioria dos mesmos encontra-se com pouca disponibilidade de informações ou anexados a outros documentos, o qual sua análise requer conhecimento de ferramentas de análises complexas. Desta forma, o trabalho surge como uma oportunidade de informação direcionada aos pesquisadores para a importância do patenteamento de suas pesquisas como um meio de proteção.

CONCLUSÕES

Através destes estudos de prospecção tecnológica, foi constatado que o depósito de patentes envolvendo a utilização de lipases para a fabricação de detergentes não é recente, sendo seu marco inicial em 1972. Países com bons índices educacionais servem de sede para grandes empresas privadas realizarem suas pesquisas e depósitos de patentes.

Isso demonstra que o estudo de prospecção do uso de lipase na produção de detergentes é uma oportunidade interessante de pesquisa haja visto que a área é pouco investida e explorada no país na forma de patentes, dessa forma o presente trabalho vem como uma contribuição para as pesquisas na área.

REFERÊNCIAS

AHMAD, E.; FATIMA, S.; KHAN, M. M.; KHAN, R. H. More stable structure of wheat germ lipase at low pH than its native state. ***BIOCHIMIE***, 92(7), 885-893, 2010. doi: 10.1016/j.biochi.2010.03.023.

COLLA, M. L.; PRIMAZ, L.A.; BENEDETTI, S.; LOSS, A.R.; LIMA, M.; REINEHR, S.; BERTOLIN, E.T.; COSTA, V.A.J. Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. ***BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY,***2(47), 461-467, 2016. doi: 10.1016/j.bjm.2016.01.028.

COLLEG, V.D.G.; CHENNAI; ARUMBAKKAM; TAMILNADU; INDIA. Isolation and screening of lípase producing microorganism from soild and comparative study of enzyme activity with different substrates. ***INTERNATIONAL JOURNAL OF SCIENTIFIC ENGINEERING AND TECHNOLOGY RESEARCH***, 4(30), 5778-5781, 2015.

DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. High-level production of extracellular lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants from methyl oleat. ***NEW BIOTECHNOLOGY,*** 6(28),756-760, 2011. doi:10.1016/j.nbt.2011.02.002.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. ***ENZYME AND MICROBIAL TECHNOLOGY***, 2(39), 235-251, 2006. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016.

HEMLATA, B.; UZMA, Z.; TUKARAM, K.Substrate kinetics of tiol activated hyperthermostable alkaline lípase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in bio-detergent formulation. ***BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY***, (8), 104-111, 2016. doi: 10.1016/j.bcab.2016.08.008.

JAERGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. ***CURRENTOPINION IN BIOTECHNOLOGY***, 4(13), 390-397,2002. doi:10.1016/S0958-1669(02)00341-5.

JIA, J.; YANG, X.; WU, Z.; ZHANG, Q.; LIN, Z.; GUO, H.; LIN, K.S.C.; WANG, J.; WANG, Y. Optimization of fermentation médium for extracellular lipase

production from *Aspergillus niger* using response surface methodology. ***BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL***, 3(57), 1-8, 2015. doi:10.1590/S1516-8913201401485.

KUMAR, S.; MATHUR, A.; SINGH, V.; NANDY, S.; KHARE, K.S.; NEGI,S. Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by Penicillium chrysogenum SNP5 grown in solid médium containing waste grease. ***BIORESOURCE TECHNOLOGY***, 15(120), 300-304, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.018.

MENG, Y.; LI. S.; YUAN, H.; ZOU, D.; LIU, Y.; ZHU, B.; LI, X.Effect of lípase addition on hydrolysis and biomethane production of chinese food waste. ***BIORESOURCE TECHNOLOGY*** (179), 452-459, 2015. doi: org/10.1016/j.biortech.2014.12.015.

RAMANI, K.; KENNEDY, J.L.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gerssardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hidrolysis. ***PROCESS BIOCHEMISTRY,*** 10(45), 1683-1691, 2010. doi:10.1016/j.procbio.2010.06.023.

SALIHU, Aliyu; ALAM, Zahangir M.; ABDULKARIM, Ismail M.; SALLEH, Hamzah M. Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. ***RESOURCES, CONSERVATION AND RECYCLING***, (58), 36-44, 2012. doi:10.1016/j.resconrec.2011.10.007.

XIAOLIN, Y.; WANG, N.; FANG,Y.; PHILLIPS, O.G.; JIANG, F.; HU, J.; LU, J.; XU, Q.; TIAN, D.Impactos surfactants on the lípase digestibility of gum arabic-stabilized O/W emulsions. ***FOOD HYDROCOLLOIDS,*** 2(33), 393-401, 2013. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.04.013.

XIAO-LU, L.; ZHANG, W.H.; WANG, Y.D.; DAI, Y.J.; ZHANG, H.T.; WANG, Y.; WANG, H.K.; LU, F.P.A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzeri* PS59 suitable for detergent formulation. ***JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS*** (102),16-24, 2014. doi:10.1016/j.molcatb.2014.01.006.

ZHANG, R.; ZHAO, L.; LIU, R. Deciphering the toxicity of bisphenol a to *Candida rugosa* lípase through spectrofotometric methods. ***JOUNAL OF PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY***, (163), 40-46, 2016. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.011.

ZHAO H.; CHEN D.; TANG J.; JIA G.; LONG D.; LIU, G.; CHEN, X.; SHANG, H. Partial Optimization of the 5-Terminal Codon Increased a Recombination Porcine Pancreatic Lipase (opPPL) Expression in *Pichiapastoris*. ***PLOS ONE,*** 9(12), 1-16, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0114385.

CAPÍTULO IV

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger* ATCC 1004 PRODUZIDA A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA

JEQUIÉ-BAHIA

OUTUBRO/2017

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASE DE *ASPERGILLUS NIGER* ATCC 1004 ISOLADA DO ÓLEO DE SOJA

RESUMO

A utilização de lipases fúngicas na indústria de detergentes vem adquirindo cada vez mais espaço devido às suas propriedades na quebra de triacilgrlicerídeos, tornando-se uma alternativa de metodologia biodegradável. Nesse sentido, este trabalho avaliou a aplicação de lipase no processo de remoção de manchas de óleos em tecidos de algodão. A lipase foi produzida pelo fungo *Aspergillus niger* durante a fermentação em fase submersa com óleo de soja. A produção foi otimizada com o auxílio da matriz Doehlert, as variáveis otimizadas foram: concentração do indutor, tempo e temperatura de fermentação. A caracterização da lipase foi realizada e as melhores condições para a determinação da atividade enzimática foram: pH 7,0 e temperatura de 40 °C. A termoestabilidade foi avaliada e temperaturas cima de 60 °C diminuem a atividade da enzima. Os valores encontrados para as constantes cinéticas foram K_m 36,14 mM e $V_{máx}$ 6,53 U.min^{-1}. O ácido cítrico e o ácido ascórbico ocasionaram maior inibição na atividade da enzima. A imobilização se mostrou eficiente no aumento da atividade da lipase. A massa molecular da lipase de 36 kDa foi determinada através de eletroforese. A adição da enzima nas soluções de detergentes comerciais potencializou a remoção de manchas de óleos dos tecidos.

Palavras-chave: lipase, *Aspergillus niger*, detergentes.

INTRODUÇÃO

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilglicerol para glicerol e ácidos graxos livres (Sharma e Kanwar 2014). São amplamente distribuídas na natureza e foram encontradas em muitas espécies de animais, plantas, bactérias, leveduras e fungos e tais lipases de diferentes origens diferem amplamente em propriedades físicas e bioquímicas (Saeed *et. al.,* 2005).

Dentre os meios de obtenção da lipase, os mais valorizados pela indústria são as lipases microbianas devido à versatilidade de suas propriedades (Roveda *et. al.,* 2010), principalmente à fácil produção em massa, que pode ser aprimorada pela seleção de microrganismos potentes, manipulação genética e otimização de condições de crescimento (Dayanandan *et. al.,* 2013).

Muitos trabalhos relatados na literatura demonstam a utilização de diversos microrganismos conhecidos por produzir diferentes tipos de lipase, dentre os gêneros destacam-se *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum, Fusarium e Aspergillus*.

Nesse sentido, o *Aspergillus niger* foi selecionado como produtor da lipase no presente trabalho. Através de métodos multivariados, a produção foi otimizada e a lípase foi caracterizada para posterior aplicação.

Dentre os diversos campos de aplicações industriais da lipase, destacam-se a indústria de detergentes, em que a enzima atua sobre manchas que contém gorduras, transformando os triglicerídeos em ácidos graxos que, em pH alcalino, formam carboxilatos, solúveis em água (HEMLATA *et. al.,* 2016).

Diante de tal contexto e considerando e considerando o expressivo uso da lípase na indústria de detergentes, o objetivo do trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar a lípase de A*spergillus niger* ATCC 1004 isolada do óleo de soja.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

Aspergillus níger ATCC 1004 (lote 068840018), cedido pelo Laboratório de Farmacotécnica da UESB campus de Jequié, foi cultivado por 5 dias a 30°C em placas de Petri contendo 20 mL de meio sólido PDA (HIMEDIA).

Condições de Fermentação

A 100 mL de água destilada foi adicionado 0,3 g de extrato de levedura, 1 mL tween 80 (Sigma); 0,4 g Na_2HPO_4 (Sigma); 0,0041 g $MgSO_4.7H_2O$ (Synth) e 3 mL de óleo de soja. As fermentações foram submetidas a esterilizações em autoclave a 120°C e 1,0 atm por 15 min. Após resfriamento e adição de 3 discos do microrganismo, as fermentações foram conduzidas em incubadora shaker (Incubadora Shaker SOLAB SL 222) durante 5 dias a 120 rpm e 30°C.

Obtenção do Extrato Enzimático Bruto

Após o processo fermentativo, o meio foi filtrado à vácuo. O extrato multienzimático armazenado a 4°C foi utilizado como fonte da enzima lipase produzida.

Planejamento Doehlert para produção da lipase

Foi realizado um Delineamento Doehlert e aplicada a metodologia de superfície de resposta para obter condições ótimas de produção de lipase pela FES. Para isso foi avaliado a influência de duas variáveis independentes, concentração do indutor (5 níveis), tempo (5 níveis) e temperatura (3 níveis). Para estimativa do erro puro foi realizado três repetições no ponto central. O planejamento teve um total de treze ensaios. Na tabela 4.1 são apresentados os valores originais e codificados para cada variável e nível estudado.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada, para obter o resíduo puro e uma ANOVA de regressão com o teste para a falta de ajustamento da variável atividade específica de acordo com o modelo:

$$y=\beta 0+\Sigma\beta iXi+\Sigma biiXi2+\Sigma\beta ijXiXj+\Sigma\beta ijXiXjXk+\varepsilon$$

Onde, y é a variável predita, β0 o intercepto; βi o coeficiente linear, βii o coeficiente quadrático; o βij o coeficiente de interação, Xi, Xj e Xk são os valores codificados para os níveis das variáveis Xi, Xj e Xk e ε é o erro aleatório.

Os parâmetros da regressão foram testados, sendo considerados significativos quando $p < 0,1$. Na ANOVA foi utilizado o teste estatístico de Fisher (teste F). O software utilizado foi o programa *Statistica versão 7.0* (STATSOFT 2007).

Efeito do pH e Temperatura na atividade da lipase

O design experimental Doehlert foi aplicado para avaliar a influência de duasvariáveis independentes: pH (3 níveis) e temperatura(3 níveis). O erro puro foi estimado em três repetições no ponto central, para um total de nove testes. Na tabela 4.3 são apresentados os valores originais e codificados para cada variável e nível estudado.

Os parâmetros da regressão foram testados, sendo considerados significativos quando $p < 0,1$. Na ANOVA foi utilizado o teste estatístico de Fisher (teste F). O software utilizado foi o programa *Statistica versão 7.0* (STATSOFT 2007).

Determinação da Atividade Enzimática

A atividade foi determinada através da quantificação de *p*-nitrofenol (*p*-NP), a partir da curva padrão. Foram preparadas duas soluções A e B, solução A: 60 mg de *p*-NPP (Sigma-Aldrich) em 20mL de álcool iso-propílico (BIOTEC), solução B: 4g de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 0,4g de goma arábica (Synth) em 200mL de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 7. Nos ensaios reacionais foi utilizado 1mL da solução A, 9mL da solução B e 1mL do extrato enzimático. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho maria (SOLAB SL - 150/4A) a 40 °C durante 10 min. O branco foi submetido ao mesmo procedimento, no entanto foi adicionado tampão no lugar do extrato enzimático. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (GEHAKA UV – 340G) a 410 nm. A unidade de atividade enzimática (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto

de reação (µmol/min), nas condições de ensaio. A atividade enzimática foi calculada conforme a equação 1.

(Eq.1) $$UA = \frac{\mu mol\ de\ p{-}Npp}{tempo\ (min.)}$$

Onde, UA é a unidade de atividade enzimática, a concentração é o valor encontrado na curva padrão e o tempo é o tempo de reação em minutos.

Determinação da Proteína Total

A concentração de proteína foi realizada no extrato enzimático de acordo o método proposto por Bradford (1976) (Zaia, 1997), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade específica foi calculada a partir da divisão da atividade enzimática pelo valor de proteína total.

Purificação – Precipitação com sulfato de amônio

Ao extrato enzimático foi adicionado sulfato de amônio (Sigma) para fornecer 70% de saturação. O sal foi adicionado lentamente com agitação branda e a mistura permaneceu em repouso por 24 horas a 4°C. Em seguida o extrato foi centrifugado em centrífuga (TECNAL) a 5000 rpm durante 10 min. O precipitado foi suspenso em tampão fosfato de sódio 50mM pH 7 (10% do volume inicial do extrato).

Estudo de Inibidores

O estudo do efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima foi conduzido, através da medida da absorbância a um λ=410nmpela liberação do 4-nitrofenol liberado por meio da hidrólise do P-4-palmitato de nitrofenila (p-NPP) (Sigma) após reação de 1,0 mL da solução A e 9,0 mL de solução B durante 10 min a 40°C contendo os reagentes químicos: uréia (VETEC), ácido cítrico (Synth), cloreto de sódio (Synth),sulfito de sódio(Synth), cloreto de potássio (Synth), cloreto de bário (Synth), sulfato de cobre (VETEC) e ácido ascórbico (Sigma), em diferentes concentrações.A porcentagem relativa da inibição para cada inibidor foi calculada usando a equação 2:

(Eq. 2) $$[\ (A_o - A_1)/A_o] \times 100$$

onde: A_o é a atividade da enzima (controle)

A_1 é a atividade da enzima na presença do inibidor

Determinação da termoestabilidade enzimática

A termoestabilidade foi avaliada incubando o extrato bruto em diferentes temperaturas (60, 70 e 80 °C) por 40 min, alíquotas foram retiradas das amostras a cada 10 min de incubação e em seguida foram submetidas às análises de atividade enzimática conforme já descrito.

Determinação dos Parâmetros cinéticos

Para a determinação das constantes cinéticas da lipase (*Km e Vmax*), as concentrações do substrato *p*-NPP foi variada de 1,32 a 13,24 mM para determinação da atividade enzimática conforme já descrito. Os valores de *Km e Vmax* foram calculados a partir da equação da curva de Lineweaver-Burk.

Imobilização Enzimática

0,5 g de sílica (Synth) foi adicionado a 2 mL do extrato enzimático, a mistura foi mantida sob agitação constante de 60 rpm, a 25 °C por 1,5 h. Em seguida, coletou-se o sobrenadante e lavou-se o suporte com pequenas porções de solução tampão fosfato-citrato pH 7,0. Após secagem, adicionou-se 2 mL da solução A e 14,4 mL de solução B, deixando sob agitação constante a 60 rpm, 40 °C, por 15 min. O sobrenadante foi coletado e determinado a atividade enzimática. A atividade foi calculada conforme equação 3:

(Eq. 3) $$Atividade = \frac{Atividade\ (UA)}{Massa\ de\ sílica\ (g)}$$

Purificação por Cromatografia de Exclusão Molecular

O extrato enzimático bruto foi aplicado a uma coluna Sephadex G-100 (20 x 1,0 cm) (Sigma) previamente equilibrado com tampão fosfato de sódio (0,05 mol L^{-1}, pH 7,0), que também foi usado como eluente. Foram coletadas frações de 1,5 mL e verificado a proteína pelo método de Bradford (1976).

Determinação do Peso Molecular da lipase por Eletroforese

A placa para eletroforese foi preparada com gel de concentração de 4% e separação de 12%. A eletroforese desenvolveu-se em tampão Tris-Glicina SDS (Sigma), à temperatura de 4°C e com corrente de 33 mA. As amostras foram diluídas antes da aplicação no gel na proporção 4:1 em sistema tampão. O gel

permaneceu sob corrente constante até a saída do corante, sendo corado com prata. As proteínas padrões utilizadas foram: albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), desidrogenase do músculo do coelho (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsina de pâncreas bovino (24 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), α-lactoalbumina (14,2 kDa) e aprotinina de pulmão bovino (6,5 kDa).

Adição de extrato enzimático em soluções de detergentes para remoção de manchas em tecidos

Tecidos de algodão 3 x 3 cm^2 foram manchados com óleo de motor residual mantidos submersos em beckers por 2 minutos. Os tecidos manchados ficaram estendidos em varal à temperatura ambiente para que as manchas pudessem secar durante 24 horas. Os tecidos foram lavados a 40ºC, em triplicata, sob agitação de 150 rpm em shaker rotatório (SOLAB 222), por 15 minutos em erlenmeyers de 250 mL contendo a solução de detergente comercial (diluído com água destilada a 7mg/mL e fervido por 15 minutos) e o extrato nas seguintes condições:

1. 25 mL de Água destilada
2. 25 mL de solução detergente
3. 20 mL de solução detergente + 5 mL de extrato enzimático purificado

Após as lavagens todos os tecidos foram secos em estufa (SOLAB SL 102) a 50ºC durante 40 minutos e comparados visualmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA LIPASE

Um planejamento Doehlert de três variáveis foi realizado variando a concentração de indutor, tempo e temperatura, para a otimização das variáveis que apresentam influência na produção da lipase. A Tabela 4.1 apresenta as variáveis estudadas no planejamento.

Tabela 4.1- Matriz Doehlert para três variáveis na otimização da produção da lipase.

Exp.	Indutor (%)	Tempo (hs)	Temperatura (°C)	Atividade (UA)
1	5 (0,866)	120 (0)	30 (0)	2,42±0,023
2	4 (0,289)	96 (-0,5)	20 (-0,816)	3,70±0,016
3	4 (0,289)	96 (-0,5)	40 (0,816)	1,37±0,021
4	4 (0,289)	144 (0,5)	20 (-0,816)	0,89±0,011
5	4 (0,289)	144 (0,5)	40 (0,816)	1,05±0,005
6	3 (0)	72 (-1)	30 (0)	2,38±0,018
7	3 (0)	120 (0)	30 (0)	5,60±0,007
7.1	3 (0)	120 (0)	30 (0)	5,46±0,032
7.2	3 (0)	120 (0)	30 (0)	5,47±0,028
8	3 (0)	168 (1)	30 (0)	1,60±0,009
9	2 (-0,289)	96 (-0,5)	20 (-0,816)	4,11±0,007
10	2 (-0,289)	96 (-0,5)	40 (0,816)	0,30±0,004
11	2 (-0,289)	144 (0,5)	20 (-0,816)	0,28±0,001
12	2 (-0,289)	144 (0,5)	40 (0,816)	0,72±0,003
13	1 (-0,866)	120 (0)	30 (0)	0,61±0,003

UA: Unidade de Atividade °C: Graus Celsius

As combinações de experimentos mostradas na Tabela 4.1 foram geradas a partir da projeção plana de face quadrada (cubo octaedro) empregada no planejamento para 3 variáveis, tendo como ponto central a concentração de indutor de 3%, tempo de 120 hs e temperatura de 30 °C.

A “resposta” obtida comprovou que as variáveis estudadas influenciam o processo de produção enzimática. Com a finalidade de fornecer uma medida do erro puro e avaliar a variância da resposta prevista, as leituras dos experimentos 7, 7.1 e 7.2 foram realizadas no ponto central, utilizando concentração de indutor de 3%, tempo de 120hs e temperatura de 30 °C.

Os dados obtidos geraram as superfícies de resposta e os gráficos de curvas de níveis que são apresentados nas Figuras 4.1,4.2 e 4.3.

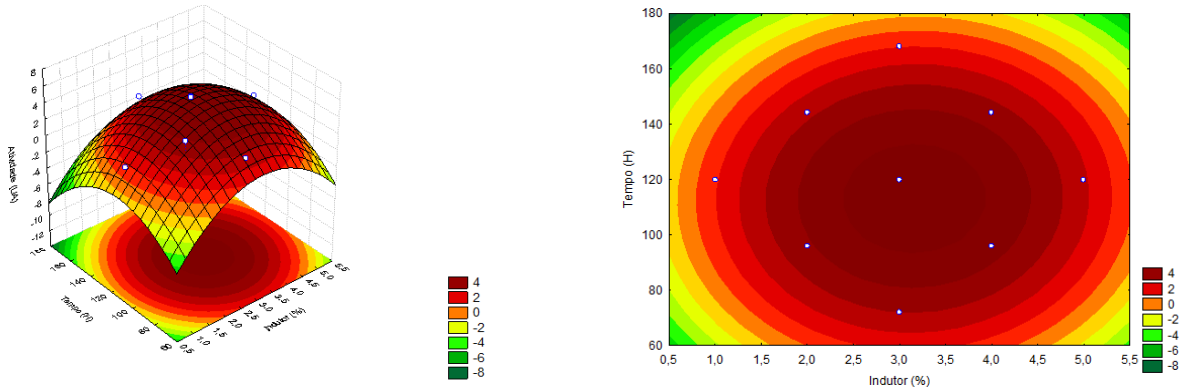

Figura 4.1: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: tempo e % de indutor, empregadas na otimização da produção enzimática.

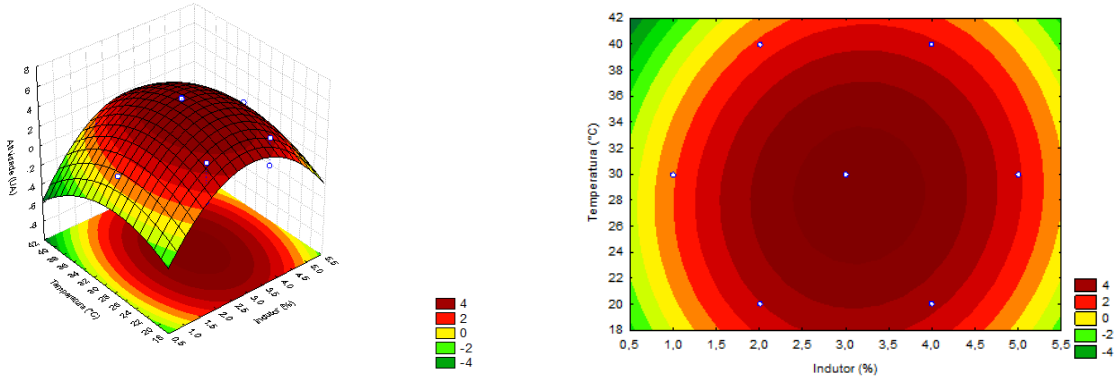

Figura 4.2: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: temperatura e % de indutor, empregadas na otimização da produção enzimática.

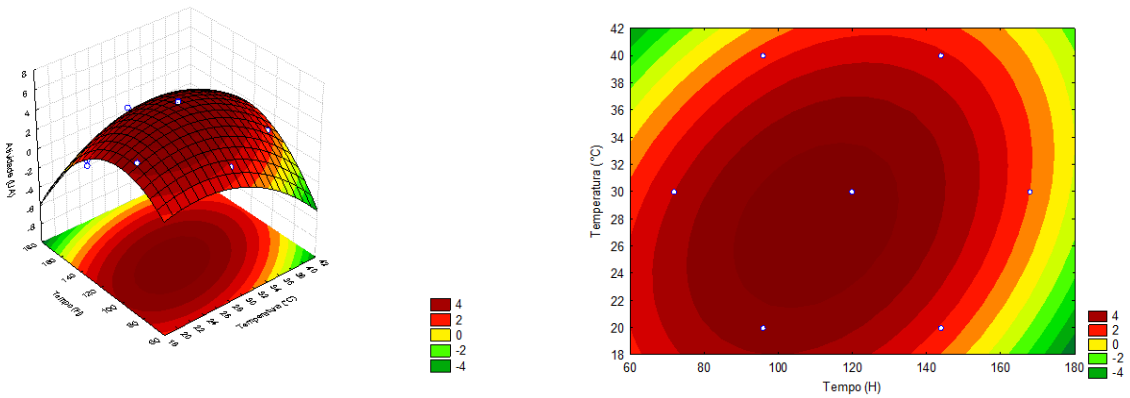

Figura 4.3: Superfície de resposta e curva de nível gerada para as variáveis: temperatura e tempo, empregadas na otimização da produção enzimática.

A equação gerada apresenta a resposta global.

$$\text{Atividade} = -26{,}08 + 5{,}70(\textit{indutor}) - 0{,}99(\textit{indutor})^2 + 0{,}24(\textit{tempo}) - 0{,}02(\textit{tempo})^2 + 0{,}02(\textit{indutor})(\textit{tempo}) + 0{,}01(30)(\textit{indutor}) + 0{,}03(30)(\textit{tempo}) + 2{,}65(\textit{temperatura})$$

A Figura 4.4 apresenta o diagrama de Pareto que representa a interação entre as variáveis a um intervalo de confiança de 95%(p>0,05).

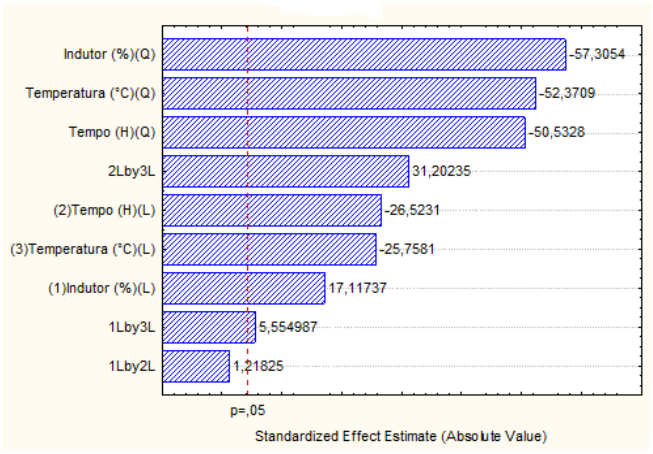

Figura 4.4- Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas (concentração de indutor, temperatura e tempo) na otimização da produção de lípase

A análise do diagrama de Pareto permite observar as interações entre as variáveis estudadas, sendo que a maioria das interações apresenta significância na produção enzimática.

De acordo com o diagrama, o aumento da produção de lipase é observada para baixos valores de concentração de indutor, isso já era previsto,

pois o excesso de indutor no meio afeta diretamente a quantidade de lipase a ser excretado pelo microrganismo.

A avaliação do modelo foi feita também através da ANOVA (Análise de Variância), que estima a significância dos efeitos principais e das interações entre as variáveis.

Tabela 4.2 -Análise de Variância para o modelo quadrático usando resposta global.

Fonte de Variação	[1]SQ	[2]GL	[3]MQ	$F_{(calculado)}$	$F_{(tabelado)}$
Regressão	3,6631	9	0,407	13,25	4,77
Resíduo	0,1536	5	0,0307		
Falta de Ajuste	0,1528	3	0,0509	124,56	19,16
Erro Puro	0,000818	2	0,000409		
Total	3,8168	14			

[1]SQ = soma quadrática, [2]GL = grau de liberdade, [3]MQ = média quadrática.

Utilizando o teste de significância F considerando que seus respectivos graus de liberdade estão associados às variâncias de regressão e residual para avaliação dos resultados, fica evidente a relação da média de regressão quadrática e a média quadrática dos resíduos para um nível de confiança de 95% tendo valor igual a 13,25, maior que 4,77 para 9 e 5 graus de liberdade, este foi o indicativo que o modelo matemático descreve bemos dados experimentais. Outro dado importante para a avaliação do modelo é a falta de ajuste. A relação entre a média quadrática da falta de ajuste e a média do erro puro para um nível de confiança de 95% foi igual a 124,56, maior que 19,16 para 3 e 2 graus de liberdade. Dessa forma, o modelo apresentou falta de ajuste, um resultado diferente do qual era previsto. No entanto, a presença de falta de ajuste pode ser explicada pelo fato de o planejamento ser realizado com microrganismos, os quais possuem vários fatores biológicos que fogem do controle do operador.

DETERMINAÇÃO DO pH E TEMPERATURA ÓTIMOS PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Um planejamento de duas variáveis foi aplicado para determinar simultaneamente os valores ótimos de pH e temperatura da atividade enzimática da lipase. A Tabela 4.3 apresenta as variáveis estudadas no planejamento.

Tabela 4.3: Matriz para duas variáveis na otimização da atividade da lipase.

Experimento	pH		Temperatura (°C)	Atividade (UA)
1	5	(-1)	30 (-0,816)	0,723±0,010
2	6	(0)	30 (-0,816)	1,33±0,006
3	7	(1)	30 (-0,816)	11,06±0,001
4	5	(-1)	40 (0)	0,972±0,057
5	6	(0)	40 (0)	1,48±0,093
5.1	6	(0)	40 (0)	1,53±0,001
5.2	6	(0)	40 (0)	1,48±0,002
6	7	(1)	40 (0)	11,44±0,001
7	5	(-1)	50 (0,816)	0,346±0,015
8	6	(0)	50 (0,816)	0,350±0,008
9	7	(1)	50 (0,816)	5,52±0,0075

UA: Unidade de Atividade

A “resposta” obtida comprovou que o pH e a temperatura influenciam na atividade da enzima lipase. Com a finalidade de fornecer uma medida do erro puro e avaliar a variância da resposta prevista, as leituras dos experimentos 5, 5.1 e 5.2 foram realizadas no ponto central, utilizando pH 6 e temperatura de 40 °C.

Os dados obtidos geraram a superfície de resposta e o gráfico de curva de níveis apresentados na Figura 4.5.

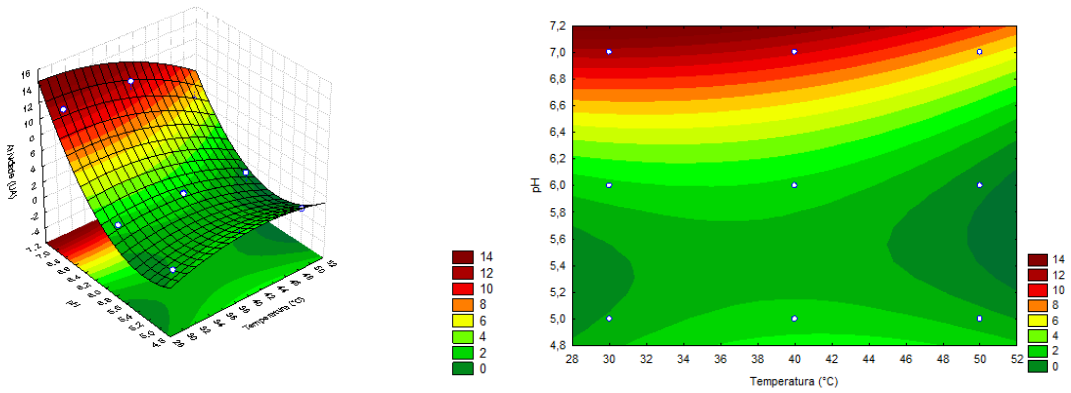

Figura 4.5- Superfície de resposta e curva de nível geradas para as variáveis: pH e temperatura, empregadas na otimização da produção enzimática.

A equação gerada apresenta a resposta global.

$$\text{Atividade} = 77{,}15 + 1{,}64\,(pH) - 0{,}0119\,(pH)^2 - 39{,}68\,(temp) + 4{,}12\,(temperatura)^2 - 0{,}135\,(pH)\,(temperatura)$$

A Figura 4.6 apresenta o diagrama de Pareto que representa a interação entre as variáveis a um intervalo de confiança de 95%(p>0,05).

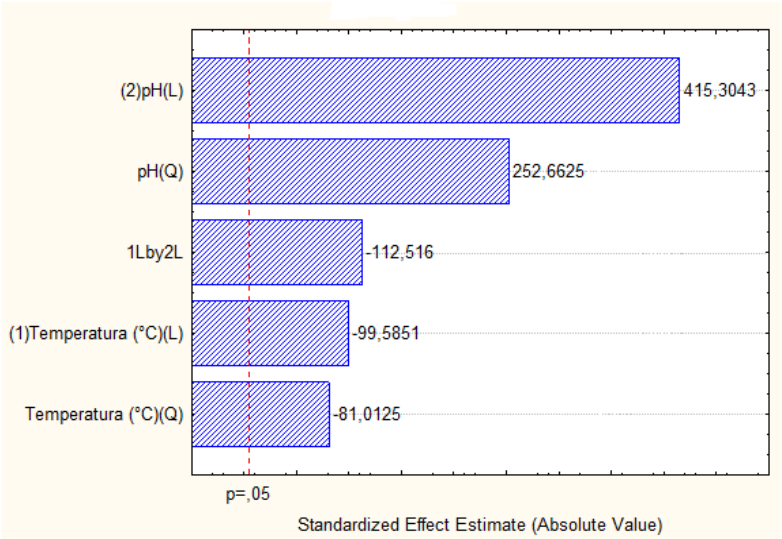

Figura 4.6- Diagrama de Pareto para as variáveis estudadas (concentração de indutor, temperatura e tempo) na otimização da produção de lipase.

A partir da análise do gráfico de Pareto, pode-se observar que ambas variáveis (pH e temperatura) exercem influência sobre a atividade enzimática.

De maneira análoga a análise da otimização da produção, a ANOVA para o pH e temperatura também foram analisados, e novamente foi observado que o modelo matemático representa bem os dados experimentais, no entanto ainda apresenta falta de ajuste.

De acordo com os resultados obtidos através da aplicação do planejamento na otimização das variáveis que potencializam a atividade enzimática da lipase foram estabelecidas as seguintes condições: pH 7,0 e 40 °C.

Tabela 4.4 -Análise de Variância para o modelo quadrático usando resposta global.

Fonte de Variação	[1]SQ	[2]GL	[3]MQ	$F_{(calculado)}$	$F_{(tabelado)}$
Regressão	12,4492	5	2,4898	45,37	5,05
Resíduo	0,27438	5	0,0548	18,28	19,16
Falta de Ajuste	0,27428	3	0,0914		
Erro Puro	0,0001	2	0,00005		
Total	13	10			

[1]SQ = soma quadrática, [2]GL = grau de liberdade, [3]MQ = média quadrática.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA LIPASE

Os resultados obtidos para a atividade, proteína total e atividade específica da lipase encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5- Resultados obtidos na determinação da atividade, proteína total e atividade específica da lipase nos extratos.

Condições do extrato	Atividade (UA)	Proteína total (UA/mg)	AE	FP
E.B.	1,74	92,75	0,20	
E.P.P.	5,08	15,58	0,32	
E.P.	1,04	18,90	0,06	0,59
E.I.	50,94	84,95	0,60	29,27

E.B.: Extrato Bruto; E.P.P.: Extrato Parcialmente Purificado; E.P.: Extrato Purificado; E.I.: Extrato Imobilizado.

A partir da técnica de imobilização foi possível observar melhores resultados em termos de atividade para a lipase imobilizada, como mostra a Tabela 4.5. Pode-se observar que a enzima imobilizada com sílica apresentou melhores resultados em termos de atividade e atividade específica em relação à enzima livre. No momento em que há contato com a superfície hidrofóbica, o *lid* desloca-se expondo o sítio ativo da enzima, direcionando a estrutura da lipase para a conformação aberta, imobilizando-se nessa conformação e promovendo a estabilidade da enzima (Mateo *et. al.,* 2007).

PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Nas frações obtidas da cromatografia realizou-se a determinação do teor de proteínas pelo método de Bradford e a atividade enzimática da lipase. O perfil dessa etapa de purificação pode ser observado no gráfico de atividade específica da Figura 4.7.

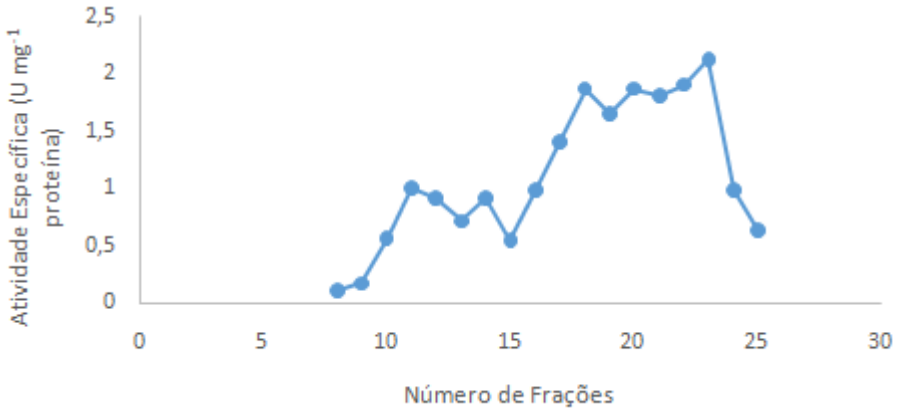

Figura 4.7- Atividade específica para a lípase.

De acordo com os resultados, a lipase foi eluída com maior atividade específica na fração 23. A separação da lipase de outras proteínas e/ou substâncias com massas molares distintas pode ser evidenciada através do monitoramento das proteínas em 280nm. As frações 20, 21, 22 e 23 foram misturadas e submetidas à liofilização, para serem analisadas quanto ao perfil eletroforético.

DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA LIPASE POR ELETROFORESE

Eletroforese SDS-PAGE foi utilizada para acompanhar qualitativamente o processo de purificação da lipase de ATCC 1004, além de ser utilizada para uma estimativa da massa molecular das lipases extraídas. A Figura 4.8 mostra inicialmente no extrato parcialmente purificado (A) a presença de diversas bandas de diferentes massas moleculares. Após a conclusão do processo de purificação em coluna sephadex (B), foi possível observar que a maioria das proteínas presentes foram reduzidas significativamente, sendo apenas preservada a proteína de massa molecular 36 kDa.

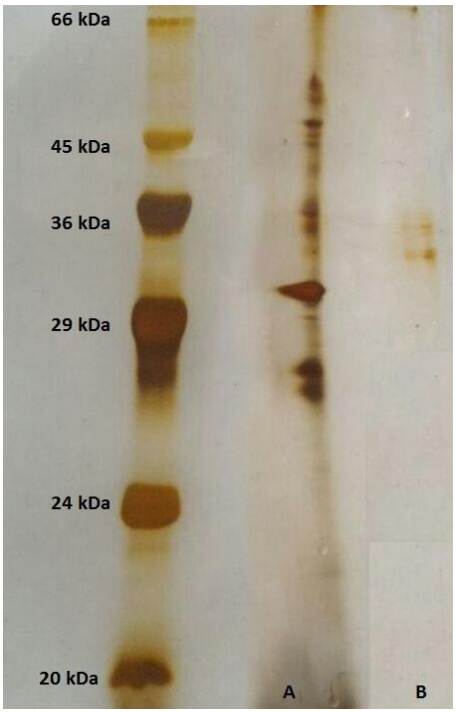

Figura 4.8: Análise da adsorção da lipase por eletroforese em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes (SDS-PAGE). A: Extrato parcialmente purificado; B: Extrato purificado.

A maioria das Lipases conhecidas do gênero *Aspergillus* foram relatadas como tendo massas moleculares na faixa de 31 a 65 kDa (Cortesini *et. al.,* 2010).

Outras lipases fúngicas apresentam massas moleculares em torno do mesmo valor, *Aspergillus niger* 35,5 kDa (Namboodiri e Chattopadhyaya, 2000 e *Aspergillus fumigatus* 38 kDa (Shangguan *et. al*. 2011).

DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICA K_M E $V_{MÁX}$

No estudo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada pela enzima lipase, o substrato p-nitrofenol foi utilizado a diferentes concentrações, nas quais possibilitaram a construção o gráfico que segue abaixo.

À medida que a concentração do substrato aumenta, a velocidade aumenta até atingir um valor máximo constante ($V_{máx}$), onde é de ordem zero em relação a concentração da lipase. Nesta região constante, ocorre uma saturação dos sítios ativos da enzima com o substrato (Lehingener *et. al*., 2011).

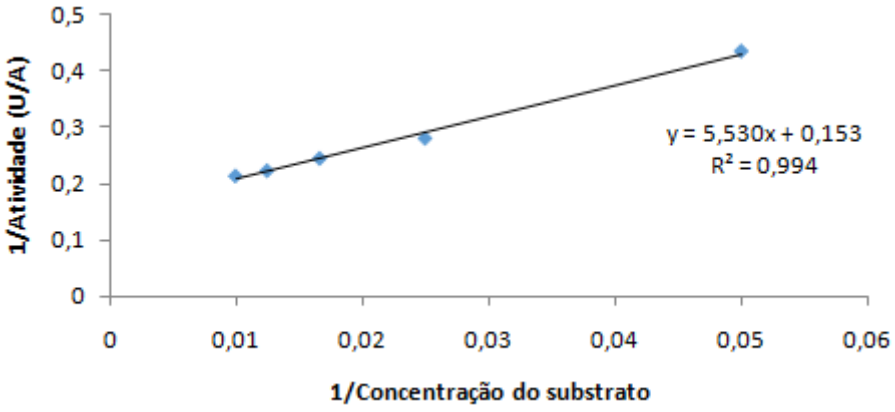

Figura 4.9- Gráfico de Lineaver-Burk para a lipase de A. niger.

Os valores de K_m e $V_{máx}$ obtidos para a lipase purificada usando solução A como seu principal substrato na presença de solução B foram: K_m 36,14 mM e $V_{máx}$ 6,53 U min^{-1}. Arijit *et. al., (*2016) encontraram valores de *Km* 53,69 mM para lípase produzida de *Aspergillus tamarii* JGIF06.

TERMOESTABILIDADE

A termoestabilidade é uma das características que influenciam a eficiência dos complexos enzimáticos, sendo o parâmetro tempo de meia vida utilizado para avaliar tal propriedade, e uma das características requeridas para as enzimas com aplicação industrial, visto que muitos processos utilizam faixas extremas de temperatura (Vasconcellos *et. al*., 2014).

A termoestabilidade das enzimas varia consideravelmente em função da sua origem, sendo as enzimas fúngicas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et. al.,* 2004).

A termoestabilidade foi estudada incubando-se o extrato em diferentes temperaturas (60°, 70°C e 80°C) a determinados intervalos de tempo (10, 20, 30, 40 e 50 min.), retirando-se alíquotas durante a incubação. As alíquotas retiradas foram submetidas a ensaios conforme descrito na metodologia.

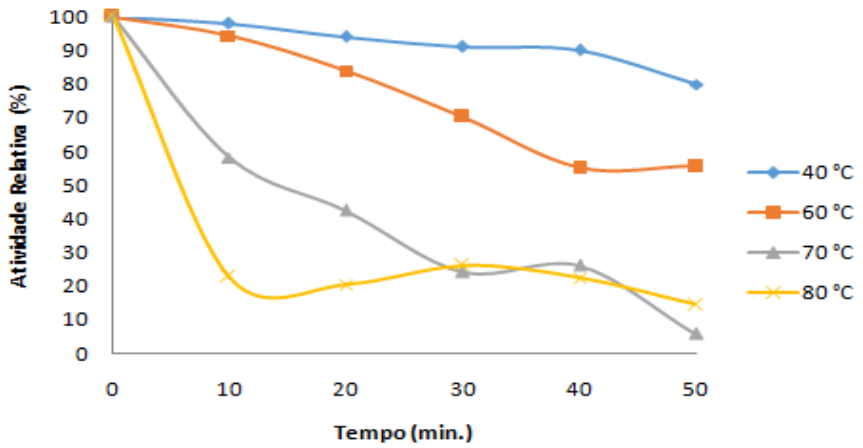

Figura 4.10 – Efeito da temperatura na atividade da lipase obtida de *Aspergillus niger*.

A lipase de *A. Niger* apresentou pouca estabilidade térmica nas temperaturas de 60, 70 e 80 °C. Na temperatura de 60 °C a 30 min. a enzima se mostrou ativa com 80% da atividade máxima. O aumento do tempo de incubação diminuiu gradualmente a atividade enzimática, até que a mesma se tornou constante entre 40 e 50 min com 60% da atividade inicial.

Nas temperaturas de 70 e 80 °C foi observado uma brusca queda no valor da atividade, relativos a 24,06% e 26,02% respectivamente em 30 min. A atividade residual a partir 30 minutos de incubação nas referidas temperaturas foi cerca de 25%. Portanto, verificou-se que temperaturas acima de 60°C causam uma inativação da lipase. Dantas e Aquino (2010) relataram que a lipase bruta de *A. Níger* obtida por fermentação submersa obteve a maior atividade em temperatura de 30°C após 60 minutos de reação de hidrólise.

ESTUDO DE INIBIDORES

As enzimas são as responsáveis pela catálise de reações do metabolismo de seres vivos, atuando sobre moléculas específicas denominadas substratos enzimáticos, que são modificadas para dar origem aos produtos da reação (Lehingener *et. al*., 2011). Porém, essa atividade das enzimas pode ser reduzida por diversos tipos de substâncias químicas, num processo que recebe o nome de inibição enzimática. Na inibição enzimática, a substância inibidora forma ligações químicas com as enzimas, de modo a interferir na sua atividade catalítica.

O efeito inibidor na atividade da lipase foi estudado incubando a enzima e os substratos na presença de substâncias nas concentrações de 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} mol L^{-1} a 40ºC durante 10 minutos. A Tabela 4.6 mostra o efeito de vários inibidores sobre a atividade da lipase parcialmente purificada.

Tabela 4.6- Efeito de alguns sais na atividade da lípase.

Substância	Concentração (mol L^{-1})		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
	%Inibição		
CH_4N_2O	34,7	7,73	6,47
$C_6H_8O_7$	92,4	54	*
KCl	*	*	20,7
$BaCl_2.2H_2O$	0	0	0
$NaHSO_3$	10,8	*	*
$CuSO_4.5H_2O$	0	44,4	32,3
$C_6H_8O_6$	80	81,5	77,3

* solução hidrolisada

As substâncias que ocasionaram maior inibição foram: ácido cítrico e ácido ascórbico. Foi observado que a inibição diminui conforme a diminuição da concentração do inibidor para a uréia e o bisulfito de sódio. Em alguns casos como na utilização de $BaCl_2.2H_2O$ a inibição não foi observada em nenhuma das concentrações, bem como no uso de KCl, que em concentrações maiores, a solução hidrolisou tornando-se leitosa a ponto de não poder ser utilizada para análises.

ADIÇÃO DE EXTRATO ENZIMÁTICO EM SOLUÇÕES DE DETERGENTES PARA TESTE DE REMOÇÃO DE MANCHAS EM TECIDOS

O desempenho da lipase de *Aspergillus níger* ATCC 1004 na remoção de manchas de óleo de motor residual. Os tecidos foram lavados com 6 marcas de diferentes detergentes comerciais. O melhor resultado foi observado com o detergente “DO33” (Figura 4.13), com 20 mL de solução detergente comercial + 5 mL de extrato enzimático (E.P.P 21,71 $U.mL^{-1}$ e E.P. 18,90 $U.mL^{-1}$) por 15 minutos a 40ºC.

Quando comparada visualmente, a lavagem do tecido com detergente adicionado com lipase (E.P.P) de *Aspergillus niger*, proporcionou uma melhor remoção das manchas de óleo de motor residual.

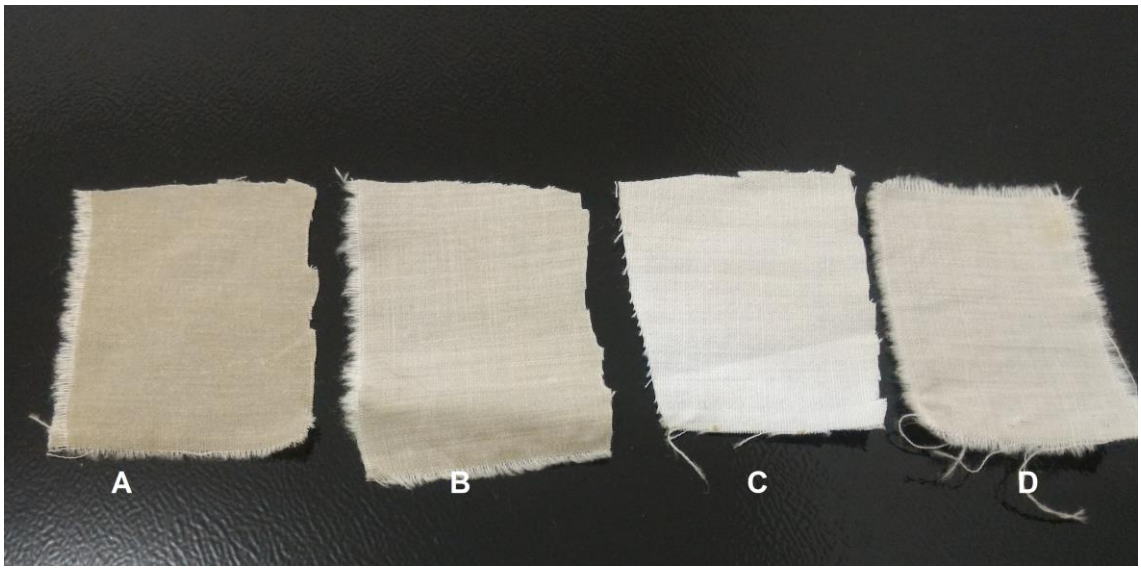

Figura 4.11. Remoção de manchas de tecidos sujos com óleo de motor residual utilizando diferentes condições de lavagem a 40ºC. (a) Tecido após a lavagem com água, (b) Tecido após a lavagem com 25 mL detergente, (c) Tecido após a lavagem com 20 mL detergente e 5 mL do E.P.P, (d) Tecido após lavagem com 13 mL de detergente e 2 mL do E.P.

Arijit*et. al.* (2016) conseguiram melhorar o desempenho em 152% na remoção de manchas de óleo de amendoim em tecidos quando usaram solução de detergente suplementadas com extrato enzimático contendo lipase de *Aspergillus tamarii* JGIF06 por fermentação submersa, nas lavagens a 25 °C e 65 °C por 30 minutos.

4.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições ótimas encontradas para a produção de lipase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa foi no tempo de 120h de fermentação, temperatura de 30 °C e concentração de indutor de 3%. A atividade específica para essas condições é de 0,32 UA/mg.

A atividade enzimática da lipase mostrou-se eficiente no pH 7,0 e temperatura de 40 °C. A lipase apresentou inativação em temperaturas maiores de 60 °C tendo atividade residual de 25%. Os valores encontrados para as constantes cinéticas foram K_m 36,14 mM e $V_{máx}$ 6,53 U min^{-1}.

O ácido cítrico e ácido ascórbico ocasionou maior inibição na atividade da enzima. A enzima imobilizada com sílica apresentou melhores resultados em termos de atividade e atividade específica, com um aumento acima de 70% em relação à enzima livre.

A separação cromatográfica da lipase ocorreu em gel sephadex G-100, onde as frações foram misturadas e submetidas a liofilização para serem analisadas quanto ao perfil eletroforético, sendo encontrado a massa molecular referente a 36 kDa.

A adição da lipase ao detergente comercial nas lavagens dos tecidos de algodão com mancha de óleo residual de moto melhorou o desempenho do detergente, removendo quase que completamente a mancha dos tecidos lavados a 40ºC.

4.3 REFERENCIAS

ARIJIT, D.; SRIVIDYA, S.; SOURAV, B.; SUJINA, S.; SWATHI, S. Purification and Characterization of a Surfactant-compatible Lipase from *Aspergillus tamarii* JGIF06 exhibiting energy-efficient removal of oil stains from polycotton fabric. **Biotech**, v. 2, n. 6, p. 2-8, 2016.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS C.J. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

DANTAS, E. M.; AQUINO, L. C. L. Fermentação em estado sólido de diferentes resíduos para a obtenção de lipase microbiana. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, n. 1, p. 81-87, 2010.

CORTESINI, J.F.; LOPES, B.D.; MACEDO, A.G.; NASCIMENTO, G.M.; CARVALHO, O.P. *Aspergillus* sp. Lípase: Potential biocatalyst for industrial use. **Journal Molecular Catalysis B: Enzimatic**, pp.163-171, 2010.

DAYANANDAN A.; HILDA V. R. S.; SHANMUGAVEl M.; GNANAMANI A.; SUSEELA R. G. Enhanced production of *Aspergillus tamarii* lipase for recovery of fat from tannery fleshings. **Braz J Microbiol**, pp.1089–1095, 2013.

GAO, Y.; BREUIL, C. Properties and substrate specificities of na extracellular lipase purified from *Ophistoma piceae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 14, p. 421-429, 1998.

HEMLATA, B.; UZMA, Z.; TUKARAM, K.Substrate kinetics of tiol activated hyperthermostable alkaline lípase of *Bacillus sonorensis* 4R and its application in bio-detergent formulation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (2016), pp.104-111.

LEHINGENER L. A.; Nelson, D. V.; Michael, M. C. **Princípios de bioquímica. básica**, 5ª ed. Porto Alegre, Artemed, 2011.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, pp. 1451-1463, 2007.

MENONCIN, S. *et al.,* Imobilização de lípases produzidas por fermentação em estado sólido utilizando *Penicillium verrucosum* em suportes hidrofóbicos. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 29, n. 2, p. 440-443, 2009.

NAMBOODIRI, V. M. H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, Champaign, v. 35, n. 5, p. 495-502, 2000.

RODRIGUES, I.M. Modelagem, simulação e controle de um processo contínuo de purificação de enzimas. [tese de doutorado]. **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 1993.

ROVEDA, M. *et. al.* Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SHANGGUAN, JIAO-JIAO; LIU, YU-QIANG; WANG, FU-JUN; JIAN, ZHAO; FAN, LI-QIANG; LI, SU-XIA; XU, JIAN-HE. Expression and characterization of a novel lipase from *Aspergillus fumigates* with high specific acttivity**. Biochem Biotechnol**, p. 949-962, 2011.

SAEED, H.M.; ZAGHLOUL, T.I.; KHALIL, A.I.; ABDELBAETH, M.T. Purification and characterization of two extracellular lipases from Pseudomonas aeruginosa. Ps–x, Pol. **J. Microbiol**, pp. 33-240, 2005.

SHARMA S. e KANWAR SS. Organic solvent tolerant lipases and applications. **Sci World J**, 2014.

SINGH, S.; BANERJEE, U.C. Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl Ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v.42, n.7, p.1063–1068, 2007.

VASCONCELLOS, V.M. *et. al*,.Estudo comparativo da termoestabilidade de enzimas produzidas por fungos filamentosos em cultivo submerso e combinado. **Embrapa Instrumentação**, Laboratório de Agroenergia, São Carlos, 2014.

ZAIA, M.A.D. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nova***,* v. 21, n. 6, 787-793,1998.