



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MICHELE CRISTINA BARRETO DA CRUZ

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
SUPLEMENTADA COM ÓLEOS VEGETAIS E RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO *Beauveria bassiana***

Londrina
2009

MICHELE CRISTINA BARRETO DA CRUZ

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
SUPLEMENTADA COM ÓLEOS VEGETAIS E RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO *Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Geni Varea Pereira

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C957p Cruz, Michele Cristina Barreto da.
Produção de lípases por fermentação submersa suplementada com óleos vegetais e resíduo agroindustrial pelo fungo *Beauveria bassiana* / Michele Cristina Barreto da Cruz. – Londrina, 2009.
101 f. : il.

Orientador: Geni Varea Pereira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2009.
Inclui bibliografia.

1. Lipase – Produção – Teses. 2. Fungos – Biotecnologia – Teses. 3. Fungos entomopatogênicos – Teses. I. Pereira, Geni Varea. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

MICHELE CRISTINA BARRETO DA CRUZ

**PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA
SUPLEMENTADA COM ÓLEOS VEGETAIS E RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL PELO FUNGO *Beauveria bassiana***

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Antonia Pedrine C. Celligoi
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Dionísio Borsato
UEL – Londrina - PR

Profª. Dra. Geni Varéa-Pereira
UEL – Londrina - PR

Londrina, 18 de Setembro de 2009.

Ao meu pai Wilson, pelo amor, incentivo, humildade e honestidade com que me criou e ao meu noivo Paulo Roberto, pelo amor, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Geni Varéa-Pereira, pela amizade, carinho e paciência durante a orientação;

Ao Prof. Dr. Dionísio Borsato pela orientação no uso da metodologia de superfície de resposta;

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL, pelas suas contribuições individuais e por cederem equipamentos e materiais que contribuíram para a realização deste trabalho. Em especial, as professoras: Suely Mayumi Obara Dói, Dalva Tomoe Miyagui e Maria Antonia P. C. Celligoi;

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pela amizade, companheirismo e ajuda;

Aos demais profissionais do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da UEL: Elda, Neusa, Sérgio, Sandra e Silvia, pelos momentos de companheirismo e descontração;

Aos meus colegas do mestrado e aos estagiários que contribuíram muito para a conclusão dos meus experimentos do mestrado;

A Irma Fernanda M. Brito, pela cumplicidade, compreensão, incentivo e amizade.

Ao meu noivo Paulo Roberto Bortoleto, pelo amor, carinho e paciência;

Ao meu querido pai Wilson Alves da Cruz, pelo incentivo, força e compreensão;

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o período de realização desta dissertação.

“Nada na vida está completamente errado.
Até um relógio quebrado,
duas vezes ao dia está marcando a hora certa.”

Paulo Coelho

CRUZ, Michele Cristina Barreto. **Produção de lipases pelo fungo *beauveria bassiana* por fermentação submersa suplementada com óleos vegetais e resíduo agroindustrial**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* produz lipases para degradar lipídeos que recobrem a cutícula protetora do exoesqueleto de insetos. Este trabalho avaliou a produção e investigou as características de ação e estabilidade de lipases extracelulares pelo fungo *B. bassiana* CG432 em cultivos submersos suplementados com óleos e resíduos gerados por refinarias de óleos vegetais. Lipases foram produzidas por fermentação em meio de Alves suplementado com óleos vegetais e resíduos oleosos (OR). Modelos fatoriais incompletos (2^{4-1} e 2^{3-1}) com ponto central e metodologia de superfície de resposta (MSR) definiram as concentrações de Triton X-100, glucose, óleo de oliva e uréia para obter alta produção de lipases com baixa biomassa em meio de Vogel. Os cultivos foram inoculados com 10^6 conídios/mL e conduzidos a 28°C, 200rpm em diferentes dias, conforme o objetivo do experimento. Extratos de lípases (EL) obtidos pela centrifugação dos cultivos foram dialisados em pH 7 e analisados quanto aos teores de proteínas, açúcares redutores e lipídeos; e quanto à atividade de lipases por dois métodos: titulometria de ácidos graxos e detecção espectrofotométrico do *p*-nitrofenol liberados pela ação da enzima sobre os substratos trioleína e palmitato de *p*-nitrofenol a 50°C e pH 8,5, respectivamente. A biomassa foi quantificada por gravimetria. A produção de lipases aumentou 70% em cultivos de 7 dias em meio de Alves suplementados com resíduo de óleo de canola quando comparadas com cultivos de 5 dias suplementados com óleo de oliva. Condições indicadas pela MSR demonstraram que cultivos de 4 dias em meio de Vogel contendo 0,35% do surfactante Triton X-100; 0,75% óleo de oliva e 1,5% uréia aumentaram produção de lípases em 229% ao mesmo tempo em que reduziram produção de biomassa em 441%. Lipases produzidas em OR apresentaram temperaturas e pH ótimos entre 40 a 60°C e 7,5 e 8,5, respectivamente, enquanto que as lipases produzidas em óleo de oliva as condições ótimas foram a 45°C e pH 8,5. Lipases produzidas em óleo de oliva foram mais estáveis que as lipases produzidas em OR sob armazenamento à temperatura ambiente, de refrigeração e de congelamento, e quando incubadas sob suas respectivas condições ótimas de atividade.

Palavras-Chave: Fungos entomopatogênicos. *Beauveria bassiana*. Produção de lípases. Metodologia de superfície de resposta. Resíduo de refinaria de óleos.

CRUZ, Michele Cristina Barreto. **Lipases production by the fungus *beauveria bassiana* in submerged fermentation supplemented with vegetable oils and agroindustrial residues.** 2009. 101 f. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* produces lipases to break down the lipids that cover the protective cuticle of the exoskeletons of insects. This study analyzed and evaluated the production, characteristics and stability of extracellular lipases produced by the fungus *B. bassiana* CG432 in submerged cultures supplemented with oils and residues generated by vegetable oil refineries. Lipases were produced by fermentation in Alves broth supplemented with vegetable oils and oily residues (OR). Incomplete factorial models (2^{4-1} e 2^{3-1}) with central point and surface response methodology (SRM) defined the concentrations of Triton X-100, glucose, olive oil and urea in order to obtain high lipase production with low biomass in Vogel broth. The cultivations were inoculated with 10^6 conidia/mL and processed at 28°C, 200rpm on different days, according to the objective of the experiment. Lipase extract (LE) obtained by centrifugation of the cultivations were dialyzed at pH 7 and analyzed for protein, sugar, redactor and lipid content. Lipase activity was evaluated by two methods: titulometry of fatty acids and the spectrophotometric detection of *p*-nitrophenol liberated by enzymatic action on the substrates trioleine and palmitate of *p*-nitrofenol at 50°C and pH 8.5, respectively. The biomass was quantified by gravimetric analysis. The production of lipases increased 70% after seven days of cultivation in Alves medium supplemented with residue of canola oil compared to production after five days supplemented with olive oil. Conditions recommended by SRM demonstrated that cultivation for four days in Vogel broth containing 0.35% Triton X-100 surfactant, olive oil and 1.5% urea increased lipase production by 229% while reducing biomass by 441%. Lipases produced in OR presented optimal temperatures and pH between 40 -60°C and 7.5 and 8.5, respectively, while optimal conditions for lipases produced in olive oil were 45°C and pH 8.5. Lipases produced in olive oil were more stable than those produced in OR under storage at room temperature, refrigeration and freezing when incubated under optimal activity conditions.

Keywords: Entomopathogenic fungi. *Beauveria bassiana*. Lipase production. Surface response methodology. Oil refinery residue.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações industriais de lipases microbianas.....	36
Tabela 2 – Matrizes experimentais (X) referentes aos planejamentos fatoriais fracionados incompletos (2^{4-1}) e (2^{3-1}) para quatro e três variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições no nível central (0).....	48
 Artigo A	
Table 1 – Production of lipases by <i>Beauveria bassiana</i> CG432 in Alves broth, 0.1% CaCl ₂ , 0.25% surfactants and supplemented with 3% vegetable oils and oily residues pretreated with neutral alumina (OR).....	59
Table 2 – Effect of NaCl concentrations on activity of lipase produced by <i>B. bassiana</i> on Alves broth supplemented with OR from canola.....	62
 Artigo B	
Table 1 – Responses and experimental domain of first experimental incomplete factorial design (2^{4-1}).....	70
Table 2 – Statistical analysis for incomplete factorial design (2^{4-1}) for first experimental design.....	71
Table 3 – Responses and experimental domain of second experimental incomplete factorial design (2^{3-1}).....	73
Table 4 – Statistical analysis for incomplete factorial design (2^{3-1}) for second experimental design.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações catalisadas por lipases: a) hidrólise, b) síntese de acilgliceróis	18
Figura 2 – Modelo hipotético da ação da tampa hidrofóbica de uma lipase pancreática ao receber seu substrato na interface óleo/água	19
Figura 3 – Reações catalisadas por lípases	20
Figura 4 – Reações catalisadas por lipases não específicas e 1,3 específicas	21
Figura 5 – Modelo estrutural de α/β hidrolases	22
Figura 6 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de <i>Mucor miehei</i> na forma aberta (ativa). Quando a tampa está aberta, a triade catalítica no sítio ativo (vermelho) torna-se acessível para o substrato (normalmente triacilgliceróis).....	23
Figura 7 – Ação de enzimas hidrolíticas no exoesqueleto de insetos.....	26
Figura 8 – Formas de produção de lipases: a) fermentação em estado sólido, b) fermentação submersa	27
Figura 9 – Reação de hidrólise do <i>p</i> -NPP.....	36
Figura 10 – Uso de enzimas microbianas em processos da biotransformação.....	37
Figura 11 – Etapas do processo de produção de lipases pelo fungo entomopatogênico <i>Beauveria bassiana</i> CG432.	51

Artigo A

Figure 1 – Growth curve (a), time course of lipase production (b), pH variations and reducing sugar concentration (c), and protein concentration (d) in fermentation by <i>Beauveria bassiana</i> CG432 in Alves broth supplemented with 3% refined olive oil (OO) (□ open symbols) or oily residue (■ closed symbols) from industrial process deodorization (OR) of vegetable oils refinery. Alves broth was added of CaCl ₂ 0.1%, inoculated with 10 ⁶ conidia ml ⁻¹ and was performed at 28°C at 200rpm	60
Figure 2 – Characteristics of ultra filtrate lipase extract produced by <i>Beauveria bassiana</i> CG432. (a) Incubation at 10 to 65°C, (b) pH sodium acetate at pH 3.5 to 6.0, sodium phosphate at pH 6.0 to 7.5, TRIS-HCl at pH 7.5 to 9.0, and sodium phosphate NaOH at pH 9.0 to 10.0.(c) Stability of	

	lipases incubated in frozen at -20°C (●), room temperature at 25°C (○) and refrigerated at 4°C (▲) over 60 days; at optimal activity conditions at 45°C and pH 8.5 assayed for p-NPP emulsion hydrolysis (□) and titrimetric method (■) by during 60 hours.....	61
Figure 3 –	Stability of ultra filtrate lipase extract produced by <i>Beauveria bassiana</i> CG432: (a) Incubated at optimal activity conditions at pH 8.5 and 40, 45, 50 and 55°C over 10 hours. (b) Stored at frozen -20°C; room temperature, 25-30°C; and under refrigeration, 4°C over 10 days. All assays were carried out for p-NPP emulsion hydrolysis	61
 Artigo B		
Figure 1	Response surface plots obtained by first experiment. Effect of Triton X-100 and urea concentrations, and their mutual interaction on lipase production (a) and effect of glucose and olive oil concentrations on biomass production (b). Other parameter concentrations are constant at 0 levels.....	72
Figure 2	Profiles for predicted values for simultaneously obtaining high lipase, and low biomass from first experiment with submersed cultures of <i>Beauveria bassiana</i> CG432. Interrupted horizontal lines represent media values of responses and the interrupted vertical lines represent the levels of the factors necessary for simultaneously obtaining optimum and desirable conditions.....	72
Figure 3	Profiles of predicted values for simultaneously obtaining high lipase (a) and low biomass (b) in the second experiment with submersed cultures of <i>Beauveria bassiana</i> CG432. Interrupted horizontal lines represent media values of responses and the interrupted vertical lines represent the levels of the factors necessary for simultaneously obtaining optimum and desirable conditions.....	75
Figure 4	Growth curve, time course of lipase production (a) and consumption of nutrients (b) by <i>Beauveria bassiana</i> CG432 cultured at 200rpm at 28°C during 8 days on Vogel broth containing CaCl ₂ 0.1%, Triton X-100	

0.35%, olive oil 0.75%, urea 1.5%. Inoculum was 1% (v/v) of a suspension containing 10^8 conidia ml^{-1} 76

Figure 5 Characteristics of ultra filtrate lipase extract produced by *Beauveria bassiana* CG432. (a) Incubation at 10 to 55°C, (b) pH sodium acetate at pH 3.5 to 6.0, sodium phosphate at pH 6.0 to 7.5, TRIS-HCl at pH 7.5 to 9.0, and sodium phosphate NaOH at pH 9.0 to 10.0.(c) Stability of lipases incubated in frozen at -20°C (●), room temperature at 25°C (○) and refrigerated at 4°C (▲) over 60 days; at optimal activity conditions at 45°C and pH 8.5 assayed for *p*-NPP emulsion hydrolysis (□) and titrimetric method (■) by during 60 hours..... 78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	ENZIMAS LIPOLÍTICAS	17
2.1.1	Lipases	18
2.2	ASPECTOS ESTRUTURAIS DE LIPASES	21
2.2.1	Mecanismos Catalíticos das Lipases	23
2.2.2	Cinética de Lipases	24
2.3	FONTES DE LIPASES	25
2.4	PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO	26
2.4.1	Fatores que Interferem na Produção de Lipases Microbianas	28
2.4.2	Fontes de Carbono e Nitrogênio para a Produção de Lipases Microbianas	29
2.4.3	Resíduo da Desodorização de Óleos Vegetais	32
2.5	ATIVIDADE LIPOLÍTICA	33
2.5.1	Ensaio em Placas de Petri (Seleção de Microrganismos)	33
2.5.2	Método Titulométrico	34
2.5.3	Métodos da Hidrólise do <i>p</i> -nitrofenol	35
2.6	APLICAÇÕES DAS LIPASES	36
2.6.1	Indústria de Alimentos	37
2.6.2	Indústria de Detergentes	38
2.6.3	Indústria de Óleos e Gorduras	38
2.6.4	Indústria de Fármacos e Química Fina	39
2.6.5	Tratamento de Efluentes	40
2.6.6	Produção de Biodiesel	41
2.6.7	Outras Aplicações	42
2.6.8	Lipases e suas Perspectivas	48
3	OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44

4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 MICRORGANISMO E PADRONIZAÇÃO DO INOCULO	45
4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	45
4.3 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS E RESÍDUOS SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES.....	46
4.4 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASES EM ÓLEO DE OLIVA E RESÍDUO DA DESODORIZAÇÃO DE ÓLEO DE CANOLA	46
4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA SIMULTÂNEA OBTENÇÃO DE ALTA PRODUÇÃO DE LIPASES E BAIXA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.....	47
4.6 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LIPASES NAS CONDIÇÕES INDICADAS PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.....	48
4.7 ENSAIO ENZIMÁTICO.....	49
4.8 DETERMINAÇÃO ANALÍTICAS	49
4.9 DETERMINAÇÃO DO pH E DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ATIVIDADE DE LÍPASES	49
4.10 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE LIPASES EM ESTOCAGEM E CONDIÇÕES ÓTIMAS.....	50
4.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ATIVIDADE DE LÍPASES.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 ARTIGO A – PRODUCTION AND SOME CHARACTERISTICS OF A LIPASES IN SUBMERGED FERMENTATION SUPPLEMENTED WITH ONLY RESIDUE BY <i>Beauveria bassiana</i>	53
5.2 ARTIGO B – SIMULTANEOUS HIGH LIPASE AND LOW BIOMASS PRODUCTION IN SUBMERGED FERMENTATION OF <i>Beauveria bassiana</i>	65
CONCLUSÕES GERAIS	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	94
ANEXO A – Cover Letter: Simultaneous High Lipase and Low Biomass Production in Submerged Cultivation of <i>Beauveria bassiana</i>	95
ANEXO B – Instruções Normativas do Process Biochemistry.....	96

ANEXO C – Manuscript number by paper submission	100
ANEXO D – Meio Mínimo de Vogel (1956), Concentrado 50x.....	101

1 INTRODUÇÃO

As lipases constituem um dos grupos de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas (JAEGER; EGGERT, 2002). São enzimas que apresentam grande afinidade a diversos tipos de substratos e catalisam reações de hidrólise das ligações éster carboxílicas presentes em acilgliceróis, com a liberação de ácidos graxos e glicerol, podendo ocorrer também reações de síntese na ausência ou em quantidades mínimas de água (JAEGER; DIIJKSTRA; REETZ, 1999).

Depois das proteases e amilases, as lipases são consideradas como o terceiro grande grupo de vendas, movimentando milhões de dólares. Essa conquista se deve tanto pela sua versatilidade de aplicação quanto pela relativa facilidade de produção em massa, tornando-as especialmente atrativas para aplicações industriais (JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases são amplamente utilizadas nas indústrias oleoquímica, alimentícia e farmacêutica; na fabricação de detergentes e no tratamento de efluentes. Podem ser encontradas em células de tecidos animais, vegetais e microrganismos como bactérias, leveduras e fungos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Do ponto de vista industrial os fungos são importantes fontes de lipases, pois, a maioria das enzimas produzidas são extracelulares, o que facilita a extração das mesmas no meio de fermentação (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; EGGERT, 2002).

A produção de lipases por microrganismos geralmente é obtida por fermentação submersa, utilizando meios de cultivo com composição mais elaborada, o que pode elevar os custos do processo e limita a utilização da enzima. Desta forma, muitos pesquisadores buscam substratos de baixo custo para viabilizar a produção da enzima (FREIRE; CASTILHO, 2008; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

Estudos sobre a utilização de diferentes microrganismos, suplementos e substratos para a produção de lipases em meio líquido, podem contribuir no sentido de encontrar combinações ideais para se obter lipases com altos rendimentos, utilizando substratos, e modelos matemáticos especiais, modelos fatoriais e a metodologia de superfície de resposta. Tais estudos possibilitam a redução dos custos da produção em escala industrial (VARGAS, 2004).

O fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* é muito utilizado para o controle biológico, apresenta ampla distribuição na natureza e pode ser facilmente cultivado em laboratório. Toxinas e enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases,

participam do processo de infecção do inseto hospedeiro, pois degradam o exoesqueleto formado por camadas de proteínas e quitina, e recoberto por uma camada protetora de ceras (CLARKSON; CHARNLEY, 1996; JARROLD et al., 2007; PEDRINI; CRESPO; JUARÉZ, 2007; STEHR et al., 2003).

Até o momento não foram encontrados na literatura trabalhos sobre a otimização da produção de lipases por fungos entomopatogênicos utilizando metodologia de superfície de resposta ou suplementação com resíduos gerados pelo refino de óleos vegetais. Hegedus; Khachatourians (1988) relataram a produção de lipases por *B. bassiana* em óleo de oliva, enquanto que Silva et al. 2005; Silva et al. 2009 estudaram a produção de lipases por *Metharhizium anisopliae*, outro conhecido fungo entomopatogênico.

Desta forma, objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção e investigar as características de ação e estabilidade de lipases extracelulares pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* utilizando meios de culturas suplementados com óleos e resíduos gerados durante o processo industrial do refino de óleos vegetais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENZIMAS LIPOLÍTICAS

As enzimas lipolíticas, lipases e esterases, constituem um grupo de enzimas de grande importância fisiológica e biotecnológica, uma vez que hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, essenciais aos processos metabólicos, como o transporte dos ácidos graxos, oxidação e síntese de glicerídeos e fosfolípidios (REED, 1975). São amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em vários organismos: animais, vegetais e também em microrganismos como fungos e bactérias (OLIVEIRA, 2000; REED, 1975).

A diferenciação entre lipases e esterases pode ser feita pela ação específica das duas enzimas. Esterases (EC 3.1.1.1) são enzimas que agem em ésteres solúveis em água ou que hidrolisam outros lípidos diferentes dos triacilgliceróis. Incluem as acilhidrolases, colesteroesterases e tioesterases (CARVALHO et al., 2003; REED, 1975). Apresentam cinética de Michaelis-Menten normal, ou seja, a atividade das esterases é proporcional ao aumento da concentração do substrato até um limite de saturação (CARVALHO et al., 2005).

Os substratos naturais para as lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de curta, cadeia média e preferencialmente longa (acima de 10C), ou seja, ligações éster tríplexes, enquanto esterases atuam sobre ligações ésteres únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molecular (BIER, 1955; BROCKMAN, 1984) e não apresentam cinética de Michaelis-Menten, pois, seus substratos devem estar agregados em número variado de moléculas na forma de micelas que são estabilizadas por moléculas adicionais de surfatantes. Deve-se enfatizar, entretanto que a maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, porém, o inverso não ocorre (JAEGER; DIIJKSTRA; REETZ, 1999).

2.1.1 Lipases

Lipases (EC 3.1.1.3), ou lipases verdadeiras catalisam a hidrólise específica de triacilgliceróis emulsificados ou a síntese de acilgliceróis através de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em ambientes aquo-restritos, conforme ilustra a Figura 1

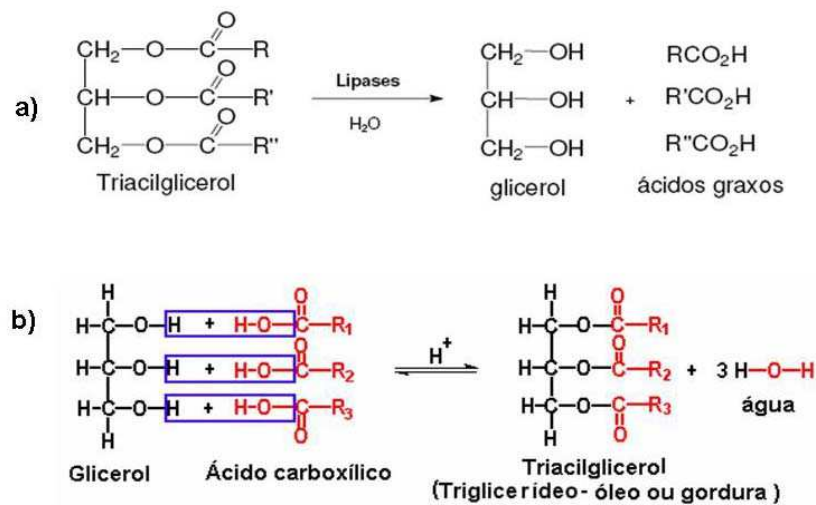


Figura 1 – Reações catalisadas por lipases: a) hidrólise, b) síntese de acilgliceróis.

As lipases não apresentam atividade hidrolítica enquanto seus substratos estão presentes na solução em estado monomérico (CARVALHO et al., 2005). A ação ocorre na interface óleo/água resultante da emulsificação de várias moléculas de substrato hidrofóbico (ativação interfacial) em estruturas tridimensionais estabilizados por moléculas adicionais de surfatantes, ou micelas, também conhecidas como super substrato, conforme ilustra a Figura 2 (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974). Segundo Sarda e Desnuelle (1958) as lipases verdadeiras se caracterizam por não apresentarem cinética de Michaelis-Menten, pois, necessitam de uma concentração mínima de substrato necessária para formar micelas (Concentração Micelar Crítica - CMC).

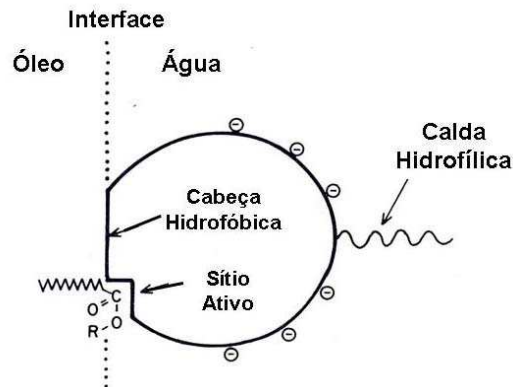


Figura 2 – Modelo Hipotético da ação da tampa hidrofóbica de uma lipase pancreática ao receber seu substrato na interface óleo/água.

Fonte: Brockerhoff e Jensen (1974).

A determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (BRADY et al., 1990), *Geotrichum candidum* (SHRAG et al., 1991) e da lipase pancreática humana (WINKLER; D'ARC; HUNZIKER, 1990), propiciou uma explicação para o fenômeno da ativação interfacial: o sítio ativo destas enzimas é recoberto por uma “tampa” hidrofóbica (*lid*), que ao interagir com a interface óleo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo. A presença da tampa na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a ser fatores determinantes para a caracterização de lipases (CARVALHO et al., 2005).

As reações de síntese com lipases, *in vitro*, podem ser através da síntese comum de éster a partir de glicerol e ácidos graxos e reações de transesterificação que são mais importantes para processos biotecnológicos, nos quais o doador do grupo acila é um éster. As reações de transesterificações de gorduras e óleos (lipídeos), dependendo do tipo de aceptor do grupo acila, são denominadas glicerólise (glicerol como aceptor) ou alcoólise (alcool como aceptor). As reações de acidólise, alcoólise e interesterificações, também fazem parte das reações de transesterificações de lipídeos. Nas interesterificações, o grupo acila é trocado entre duas moléculas de éster. A interesterificação exige uma pequena quantidade de água além daquela necessária para a enzima manter-se num estado hidratado ativo. Como a presença de muita água diminui a síntese de éster, o conteúdo de água pode ser controlado cuidadosamente para controlar a quantidade desejada dos produtos formados (OKOMURA apud FREIRE; CASTILHO, 2008). As lipases catalisam, portanto, em determinadas condições, reações de síntese, sendo algumas delas mostradas na Figura 3.

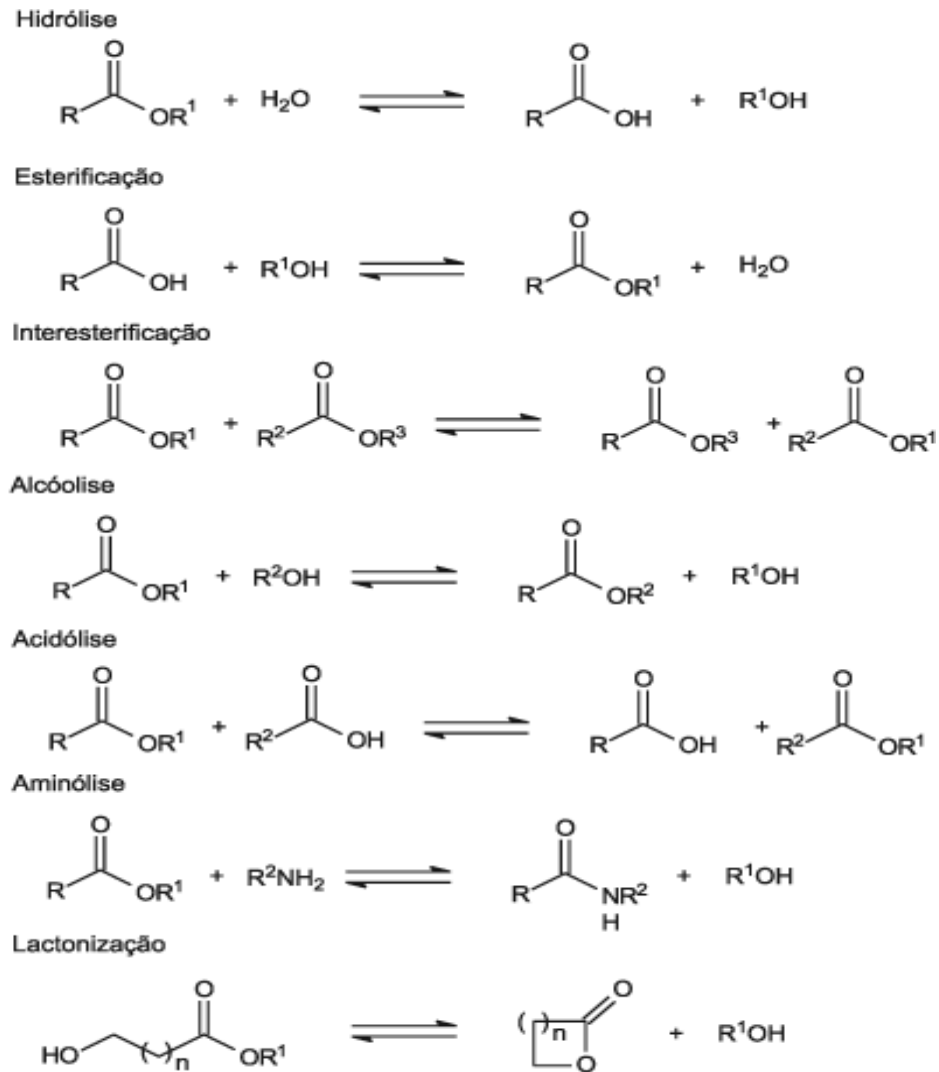


Figura 3 – Reações catalisadas por lípases.
Fonte: Paques e Macedo (2006).

Pela escolha correta da enzima e do substrato, tais reações podem ser fortemente influenciadas por estereoisomeria e, pela modificação das condições de reação, pode-se alterar o equilíbrio termodinâmico em favor da direção de síntese (WELSH; WILLIAMS, 2006). O mecanismo da reação é similar para todas as reações mediadas por hidrolases. É formado um complexo acil-enzima, seguida da subsequente liberação dos produtos finais. O tipo da reação é definido empregando-se os parâmetros que asseguram que tais reações ocorram como seleção de solvente, hidratação da enzima, tempo de reação, concentração do substrato, tamanho do substrato e sua estrutura química (ARCOS; OTERO, 1996; PARK; PASTORE, 1989; PERSSON et al., 2002; ROBERTS et al., 1995).

Devido a alta flexibilidade de agir em vários tipos de substratos quanto a sua ação específica, as lipases podem ser divididas como: regiosseletivas, quimiosseletivas e enantiosseletivas. As lipases **regiosseletivas** são subdivididas como: lipases não-específicas (que hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2) ou lipases 1,3-específicas (que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3) conforme ilustra a Figura 4. As lipases **Quimiosseletivas** são aquelas que realizam a hidrólise de ácidos graxos, cuja estrutura química pode variar de acordo com o tamanho da cadeia carbônica ou ao número de insaturação do grupo acila; e as lipases **enantiosseletivas**, são aquelas onde ocorre uma diferenciação no arranjo espacial atômico de uma enzima e seus substratos

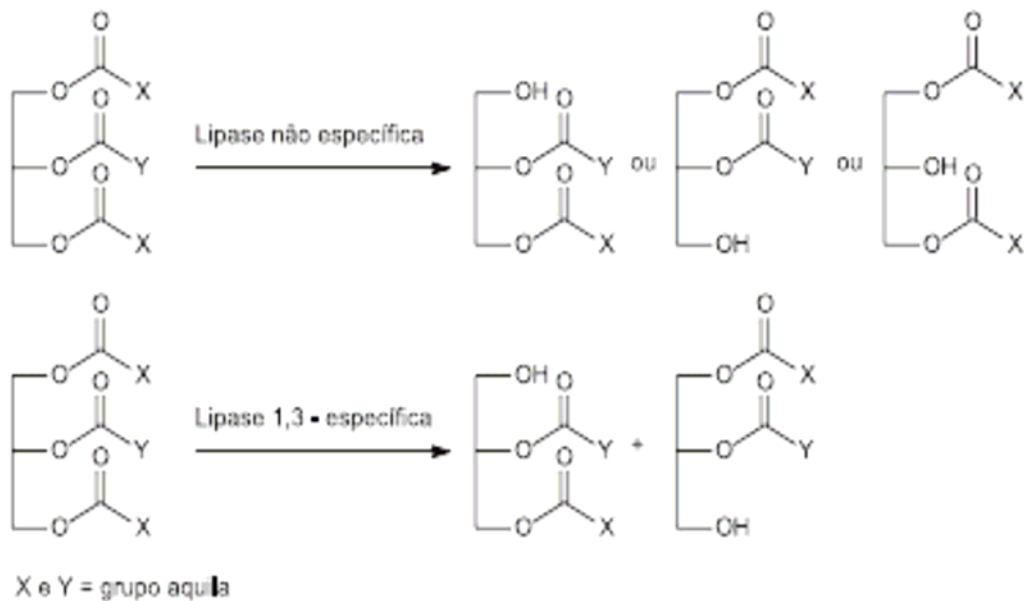


Figura 4 – Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica
Fonte: Paques e Macedo (2006).

2.2 ASPECTOS ESTRUTURAIS DE LIPASES

As lipases pertencem à classe das serino hidrolases, e, ao contrário da maioria das enzimas extracelulares de origem microbiana, não necessitam da presença de co-fatores para que possam atuar (CERNIA; PALOCCI, 1997; MILLER et al., 1988; NAKAMURA; KINOSHITA; OHNO, 1994).

A estrutura terciária das lipases, tanto de eucariotos como procariotos, é do tipo α/β -hidrolases, conforme ilustra a Figura 5 (SCHRAG; CYGLER, 1997). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeadas por porções em α -hélice. As fitas em β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fitas possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si. O sítio catalítico das lipases é composto por uma tríade contendo os resíduos dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico (Ser-His-Asp/Glu) semelhantemente observada em serino-proteases.

O sitio ativo está localizado no lado C-terminal das fitas β . O nucleófilo catalítico (serina) está localizado especificamente no C-terminal da fita β_3 em um pentapeptídeo altamente conservado (G-X1-S-X2-G, onde G= glicina; S= Serina; X1= histidina e X2= ácido glutâmico ou aspártico) que constitui o ângulo nucleofílico (EGGERT et al., 2001; JAEGER; REETZ, 1998).

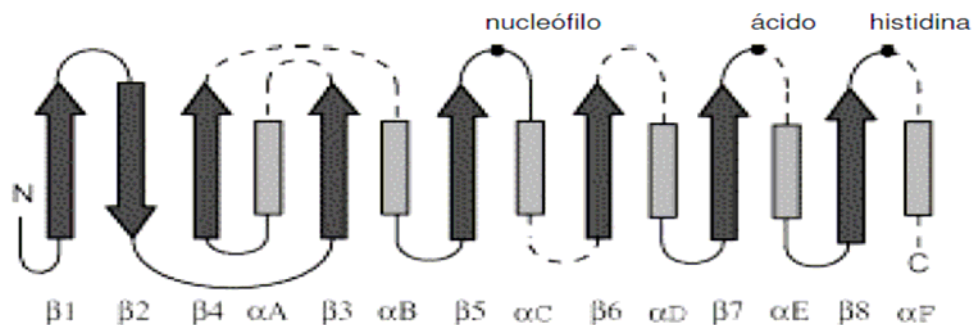


Figura 5 – Modelo estrutural de α/β hidrolases
Fonte: Pouderoyen (apud LIMA, 2004a).

Muitas lipases apresentam uma cadeia de alguns aminoácidos denominada tampa hidrofóbica que se prolonga sobre o núcleo central das fitas β e sobre o sítio catalítico (JAEGER; DIIJKSTRA; REETZ, 1999; JAGER; REETZ, 1998; SHRAG; CYGLER, 1997). Devido ao forte caráter hidrofóbico da tampa e a sua posição sobre o sítio ativo, foi proposto que ela estaria envolvida no mecanismo de catálise das lipases. Quando em presença de uma superfície óleo/água a tampa poderia interagir com a interface, sofrer uma alteração conformacional que moveria a tampa tornando o sítio ativo exposto (JAEGER; REETZ, 1998; MILED et al., 2003; SCHRAG; CYGLER, 1997), rever a Figura 2.

2.2.1 Mecanismos Catalíticos das Lipases

Os estudos realizados até o presente demonstraram a existência de duas conformações principais nas lipases a forma fechada (inativa) e forma aberta (ativa). Na conformação fechada, o sítio ativo está totalmente oculto sob a tampa. Na conformação aberta, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo, deixando-o totalmente acessível ao solvente e substrato (COSTA; AMORIM, 1999; SCHMID; VERGER, 1998), conforme ilustra a Figura 6.

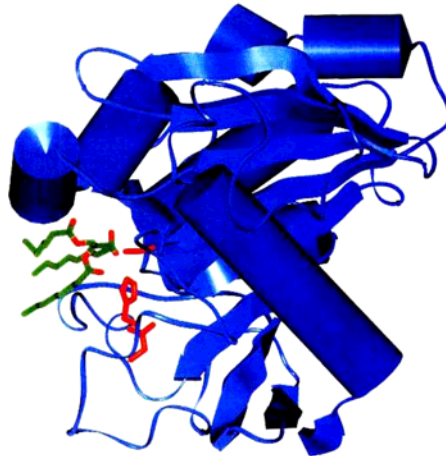


Figura 6 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da lipase de *Mucor miehei* na forma aberta (ativa). Quando a tampa está aberta, a tríade catalítica no sítio ativo (vermelho) torna-se acessível para o substrato (normalmente trigliceróis).

Fonte: Schmid e Verger (1998).

As estruturas tridimensionais das lipases conhecidas até hoje mostram que o grau de mobilidade da tampa é variável, encontrando-se desde casos em que parece haver dois estados extremos – aberto e fechado – com níveis de energia significativamente inferiores aos dos estados de transição, até casos com tampas muito móveis, com vários estados intermediários de energias comparáveis (LOUWRIER; DRTINA; KLIBANOV, 1996).

Descobriu-se mais recentemente, que várias lipases não são passíveis de ativação interfacial. É o caso, por exemplo, da lipase B produzida pela *Candida antarctica*, apesar da alta homologia desta enzima com outras lipases capazes de ativação interfacial. Por isto, a caracterização de lipases com base no conceito de ativação interfacial foi substituída

pela definição de que lipases são carboxilesterases capazes de catalisar a hidrólise de acilgliceróis de cadeia longa (VERGER, 1997).

2.2.2 Cinética de Lipases

Devido a complexidade das reações catalisadas por lipases, que ocorrem em sistemas heterogêneos como as emulsões, a cinética verdadeira destas reações não está bem esclarecida. São muitos os parâmetros envolvidos na catálise, e muitas vezes existem barreiras entre a enzima e o substrato, que normalmente oferecem resistência a difusão do substrato e dos produtos de reação (MARTINELLE; HULT, 1994).

O comportamento cinético das lipases em meio aquoso não pode ser descrito pelo modelo de Michaelis-Menten, considerando-se que este é válido para sistemas homogêneos, onde o substrato e a enzima estão solubilizados. Além disso, a formação do complexo enzima-substrato é precedida por uma adsorção reversível da enzima no agregado de substrato (micelas), que confere à esta uma conformação mais ativa, ou ativação interfacial (EGLOFF et al., 1995; JAEGER et al., 1994).

Verger, Mieras e Haas (1973) sugeriram um modelo que explica como ocorre o contato e a catálise da lipase e seu substrato emulsificado. O modelo consiste em dois equilíbrios: o primeiro se refere à interação da enzima (E) com a interface água/micela tornando-se ativa (E^*); o segundo consiste na ligação da enzima ativada (E^*) com uma molécula de substrato (S), formando o complexo E^*S . Este modelo é equivalente ao equilíbrio clássico de Michaelis-Menten em duas dimensões. Após a formação do complexo ocorre a catálise, regenerando a enzima na forma ativa e liberando o produto (LIMA, 2004a).

A maioria das lipases microbianas exerce suas funções catalíticas em condições ótimas de reação, onde são consideradas o pH, temperatura, agitação e a presença de íons durante o processo. Algumas lipases apresentam a temperatura ótima entre 45° e 65°C e pH entre 8 e 9, com exceção das lipases do feijão castor cujo pH ótimo é 4,2 e do microrganismo *Mucor pusillos* onde a faixa de pH é entre 5 e 6. Embora as lipases não necessitem de co-fatores orgânicos ou inorgânicos para ação catalítica, o meio reativo deve conter íons sódio capaz de suprimir a inibição da enzima pelo efeito da variação de cargas elétricas na interface (0,1 a 1 M de NaCl). O meio reativo deve conter também um acceptor de

ácidos graxos livres que também inibe a ação das lipases, como a albumina ou íons cálcio (de 0,02 a 0,1M de CaCl_2) (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974).

2.3 FONTES DE LIPASES

Enzimas lipolíticas podem ser de origem vegetal, concentradas em frutos e semente; de origem tecidual e digestiva em mamíferos e de origem microbiana (AIRES-BARROS et al., 1994; PASTORE; COSTA; KOBLITZ, 2003).

As lipases microbianas apresentam alta velocidade de síntese, alto rendimento de conversão de substrato em produto, grande versatilidade e maior simplicidade na manipulação ambiental e genética de sua capacidade produtiva e por isso são as mais produzidas industrialmente (ILLANES, 1994). Microrganismos produtores de lipases têm sido encontrados nos mais diversos habitats, como resíduos industriais, indústrias de óleos vegetais, laticínios, solo contaminado com óleo, sementes de oleaginosas, alimentos em decomposição, pilhas de compostagem e fontes térmicas (WANG et al., 1988).

As lipases de aplicações comerciais são predominantemente de origem fúngica. Talvez isso se explique pelo fato de que, culturalmente, a maioria das aplicações das lipases se dê na área de alimentos, na qual se empregam fungos qualificados GRAS (Generally Regarded as Safe). *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* têm sido estudados como produtores de lipases, porém, é crescente a busca de novos organismos produtores. Fungos entomopatogênicos *Metharizium anisopliae* (SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2009) e *Beauveria bassiana* (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1988) produziram altas concentrações de lipases em meios suplementados com óleos vegetais. Proteases, quitinases e lipases produzidas por estes fungos, facilmente encontrados na natureza, têm sido foco de estudos para o biocontrole de insetos praga, pois, estão envolvidas no processo da infecção fúngica, que se inicia pela degradação das camadas de cera que recobrem e protegem o exoesqueleto dos insetos hospedeiros (ALVES, 1998; TANADA, 1993), conforme ilustra a Figura 7.

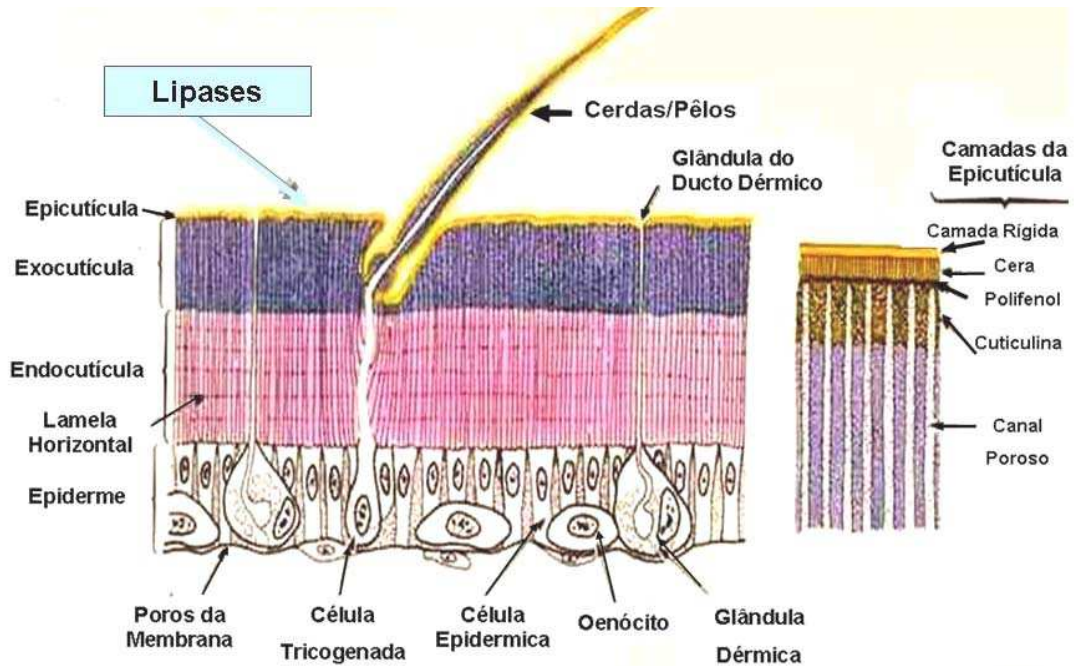


Figura 7 – Ação de enzimas hidrolíticas no exoesqueleto de insetos
Fonte: Hepburn (1985).

Em decorrência do aumento do uso de lipases em outras áreas, tem aumentado o emprego das lipases bacterianas (WATANABE et al., 1977; JAEGER et al., 1994; JAEGER; EGGERT, 2002; GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; VARGAS et al., 2004). Detergentes comerciais LUMAFast e LIPOMAX apresentam lipases de *Pseudomonas putida* e de *P. pseudoalcaligenes*, respectivamente; *Pseudomonas* também produz lipases utilizadas na hidrólise de gorduras e óleos e na produção de monoglicerídeos, usados como emulsificantes em diversos alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (KOSUGI et al., 1988; YAMAMOTO; FUJIWARA, 1998), e em síntese orgânica, para obtenção de compostos opticamente ativos (MARGOLIN, 1993).

2.4 PRODUÇÃO DE LIPASES POR FERMENTAÇÃO

As lipases microbianas têm sido produzidas por fermentação submersa e em fermentação em estado sólido, conforme ilustra a Figura 8.

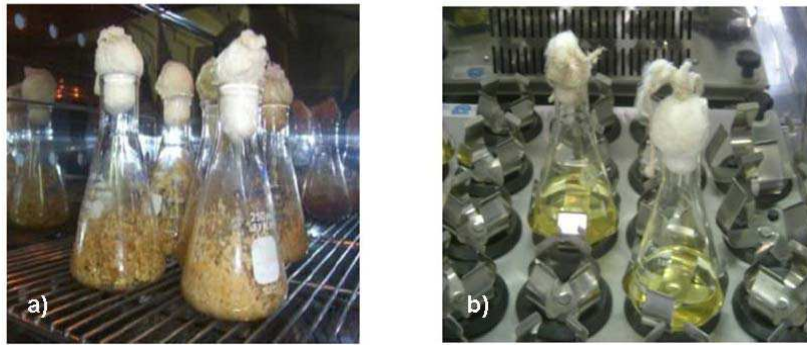


Figura 8 – Formas de produção de Lipases: a) Fermentação em Estado Sólido e b) Fermentação Submersa.

A fermentação submersa é o processo mais utilizado para produção de lipase, pois, é uma técnica de fácil operação e pode ser realizada em grande escala, pois, garante a homogeneidade do meio de cultura e facilita a extração e purificação da enzima (COUTO; SANROMÁN, 2006). Este processo é realizado em vários agitadores onde as condições nutricionais e ambientais são facilmente controladas (FREIRE, 1996).

O processo de fermentação em estado sólido utiliza substratos insolúveis com baixa porcentagem de água em sua composição (ALONSO, 2001), e por isso apresenta como vantagem o baixo custo das matérias primas empregadas no meio de cultivo e o menor risco de contaminação, porém, a produção em larga escala é prejudicada por dificuldades no controle dos parâmetros de aeração, pH, temperatura, umidade e homogeneidade do meio (COUTO; SANROMÁN, 2006).

A produção de lipases depende do controle de muitas variáveis do processo fermentativo tais como condições de temperatura e pH ambientais, tipo e concentração de surfactantes e fontes de carbono e nitrogênio. Desta forma, devido a complexidade destes processos multifatoriais e o grande número de variáveis cujos efeitos devem ser controlados, torna-se necessários o uso de metodologias apropriadas. A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma coletânea de técnicas matemáticas e estatísticas que podem ser usadas para otimizar processos biotecnológicos (SAISUBRAMANIAN et al., 2006). Delineamentos fatoriais com número definido de variáveis é vantajoso quando comparados com métodos tradicionais, porque utiliza um número reduzido de experimentos e considera o efeito de possíveis interações entre as variáveis (KALIL; MAUGERE; RODRIGUES, 2000). A RSM têm sido útil para controlar a produção de lipases microbianas (ELIBOL; OZER, 2002; KALIL; MAUGERE; RODRIGUES, 2000; SHIH et al., 2007).

O planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta permitem considerar simultaneamente vários fatores em diferentes níveis e as interações entre eles, utilizando um pequeno número de experimentos. Para aplicar a metodologia de superfície de resposta é necessário realizar primeiramente ensaios através de um planejamento fatorial. Este método consiste na seleção de um número fixo de níveis para cada um dos fatores ou variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como primeira etapa normalmente é utilizado um planejamento fatorial de dois níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável. Assim, para n variáveis envolvidas no estudo, o número de experimentos que deve ser realizado para investigar todas as combinações possíveis é igual a 2^n . Geralmente também se faz 3 ensaios no ponto central (nível 0) para permitir o cálculo do erro experimental - erro puro (BOX, HUNTER, HUNTER, 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A partir dos resultados obtidos do planejamento experimental é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a resposta, determinar quais são os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo de 1ª ordem, correlacionando as variáveis e as respostas (BOX, HUNTER, HUNTER, 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

2.4.1 Fatores que Interferem na Produção de Lipases Microbianas

Os fungos, na sua maioria, são mesofílicos, isto é, apresentam faixa ótima de temperatura de crescimento entre 25-40°C. Alguns toleraram temperaturas próximas ao congelamento da água e outras temperaturas acima de 40°C (termotolerantes). A temperatura afeta os diferentes parâmetros de crescimento microbiano, como, o tempo de adaptação (fase lag), a taxa específica de crescimento e o rendimento em células, bem como influencia tanto o metabolismo primário quanto o secundário de vários modos (CARLILE; WATKINSON, 1997).

Há deficiência de informações sobre o efeito do pH sobre os parâmetros de crescimento de fungos, apesar de haver considerável informação em relação ao efeito do pH inicial do cultivo. O metabolismo do fungo altera o pH, seja pela absorção de ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo o tamponamento é difícil de ser obtido, pois as próprias substâncias usadas como tampões podem ser assimiladas ou

podem ser tóxicas naquelas quantidades que seriam necessárias para se conseguir efetivo tamponamento. Apenas em bioreatores do tipo fermentadores o pH pode ser mantido constante durante o crescimento do fungo. A concentração do íon hidrogênio em um meio de cultura pode afetar o crescimento microbiano indiretamente, pelo seu efeito na disponibilidade de nutrientes ou, diretamente, pela sua ação nas superfícies celulares (CARLILE; WATKINSON, 1997).

Os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, magnésio e potássio são requeridos em grande quantidade porque participam da quase totalidade das substâncias celulares. O carbono, o hidrogênio e o oxigênio são fornecidos sob a forma de compostos orgânicos, de dióxido de carbono, de oxigênio molecular, e de água. Já o nitrogênio sob a forma orgânica ou inorgânica. Os outros elementos (S, P, Mg e K) são fornecidos sob a forma de sais (COLEN, 2006).

A produção de enzimas microbianas depende da relação carbono nitrogênio (HIOL et al., 2000). Um meio balanceado pode conter dez vezes mais carbono do que nitrogênio. Essa relação 10:1 garante um alto conteúdo protéico, enquanto uma relação maior, como 50:1, favorece o acúmulo de álcool, metabólitos secundários derivados do acetato, lipídeos ou polissacarídeos extracelulares (CARLILE; WATKINSON, 1997).

2.4.2 Fontes de Carbono e Nitrogênio para a Produção de Lipases Microbianas

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como substrato para a produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis e ácidos graxos (HADEBALL, 1991).

A fonte de carbono pode estimular ou inibir a síntese de lipase. Além disso, existem outros compostos que podem influenciar a produção de lipase por leveduras (HADEBALL, 1991). A levedura *C. rugosa* consegue sintetizar a lipase mesmo sem a presença de um indutor, mas em menor quantidade quando comparada à presença desta fonte de carbono como indutor (LOTTI et al., 1998). O ácido oléico é conhecido como indutor e a glicose como repressora da síntese de lipase. No estudo realizado por Obradors et al. (1993), o ácido oléico foi selecionado entre outros ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica, já que se obteve eficiente rendimento de biomassa e de produção de lipase.

A produção de lipases tem sido obtida por meios de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos (óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja), sugerindo que a enzima seja induzida por esses substratos (DEIVE; COSTAS; LONGO, 2003). Substratos lipídicos e seus metabólicos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipase. Outros substratos, não relacionados às gorduras e óleos, como os carboidratos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para síntese de lipase (DALMAU et al., 2000; LOTTI et al., 1998). Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o microrganismo utiliza - o de modo seqüencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inoculo do microrganismo em glicerol e ácidos graxos livres. Em seguida o microrganismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção da lipase. Finalmente, os ácidos graxos livres são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (MONTESINO et al., 1996). Freire et al. (1997) investigaram como fonte de carbono para a produção de lipases por *Penicillium restrictum* o óleo de oliva, a glicose e a lactose. Os resultados demonstraram que o crescimento celular para óleo de oliva e a glicose foram semelhantes, porém, a atividade enzimática foi cerca de 6 vezes superior com o uso de óleo de oliva, indicando que a produção da enzima pode ser regulada pela glucose. Na presença da lactose não houve crescimento celular e ocorreu baixa produção da enzima, devido ao microrganismo não metabolizar este açúcar.

O óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico (C18:1) e é comumente utilizado com um substrato padrão para determinação da atividade lipolítica. Montesino et al.(1996) confirmaram que o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, é o principal indutor da produção de lipase. Segundo Deive, Costas e Longo (2003), meios de cultura que continham ácido oléico e tributirina propiciaram bom crescimento de *Kluyveromyces marxianus*. O ácido oléico demonstrou ser boa fonte de carbono para a levedura, embora propiciasse aumento da biomassa, não promoveu a secreção da lipase, apesar de ter promovido o aparecimento de outras atividades enzimáticas. A tributirina, entretanto, apesar de não promover o crescimento do fungo, mostrou-se um indutor de produção da lipase. Isto foi explicado como possível preferência da enzima para triacilgliceróis formados com ácidos graxos de cadeia curta (DEIVE; COSTA; LONGO, 2003).

Hegedus e Khachatourians (1988) estudaram a produção de lipase extracelular pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* quando crescido em meio basal líquido que continha dextrose, peptona e extrato de levedura, em frascos agitados. A

adição de óleo de oliva induziu a produção da lipase, mas a adição de ácidos graxos (mirístico, palmítico, esteárico, linoléico e araquídico), ao contrário, inibiu o crescimento do fungo e a produção da lipase. Em meio de cultura mineral mínimo, a adição de óleo de oliva, apesar de também induzir a produção da enzima, não o fez com a mesma intensidade. Silva et al.(2005) investigaram a produção de lipases por uma cepa brasileira do fungo entomopatogênico *Metharizium anisopliae* em meio basal líquido suplementado com glicose, óleos vegetais e gorduras animais como fontes de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Houve crescimento fúngico em todos os meios testados, porém, a produção de lipases foi maior na presença dos óleos de oliva e girassol; principalmente quando os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e tween 80 foram adicionados após 50 horas de cultivos. Em estudos mais recentes, o surfactante Triton X-100 foi relacionado com a estimulação da secreção de uma lipase obtida da superfície dos esporos de *M. anisopliae* (SILVA et al., 2009).

A fonte de nitrogênio é um fator que tem mostrado grande influência sobre a produção de enzimas lipolíticas. Tanto o nitrogênio orgânico quanto o inorgânico, apresentam um importante papel na síntese da enzima (TAN et al.; 2003). Dentre os compostos nitrogenados usados para produção de lipase, as fontes de nitrogênio mais comuns empregadas têm sido: hidrolisados ácidos de proteínas; água de maceração de milho; farinha de soja; hidrolisados enzimáticos de proteínas (peptonas); aminoácidos; uréia; nitrato e sais de amônia (HADEBALL, 1991; MONTESINOS et al., 1996).

A seleção da fonte de nitrogênio mais adequada depende do microrganismo usado e da associação com outros ingredientes do meio de cultura (MONTESINOS et al., 1996). Tan et al. (2003) mostraram que a soja e a caseína foram as melhores fontes de nitrogênio orgânico para produção de lipase pela levedura *Candida* sp. A soja contém além da proteína o óleo que favorece a síntese de lipase. Dentre as fontes de nitrogênio inorgânico testadas o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentou o melhor resultado. No entanto, os trabalhos de Ginalska, Bancierz e Kowaslka (2004) mostraram que fontes inorgânicas de nitrogênio tais como nitrato de amônio e sulfato de amônio apresentaram efeito inibitório para a produção de lipase.

Geralmente os microrganismos apresentam alta produção de lipase quando se utiliza fonte orgânica de nitrogênio e a uréia foi considerada a melhor fonte de nitrogênio para a produção da lipase por *Geotrichium*. (GINALSKA; BANCERZ; KOWASLKA, 2004).

Shirazi et al. (apud FICKERS et al., 2004) testaram várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, como peptonas, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, uréia, sulfato de amônio e nitrato de amônio, em meios contendo 1% de óleo

de oliva como fonte de carbono. O extrato de levedura propiciou a maior produção de lipase. Para verificar a influência sobre o crescimento da *Y. lipolytica* e a produção de lipase, várias fontes de nitrogênio (mineral e orgânica) foram testadas por Shirazi et al. (apud FICKERS et al., 2004). As fontes de nitrogênio mineral não demonstraram efeito significativo tanto no crescimento da levedura quanto na produção de lipase. No entanto, observou-se um aumento da produção de lipase em meios contendo determinadas fontes de nitrogênio orgânico. Maior produção de lipase foi obtida na presença de hidrolisado de caseína, mais especificamente com triptona N1 (um hidrolisado tríptico de caseína, rico em amino-ácidos livres e peptídeos pequenos), que se sobressaiu em relação aos outros substratos de nitrogênio orgânico e mineral. Desse modo, a utilização da triptona N1 pode ser considerada interessante do ponto de vista tecnológico, mas, infelizmente, é de custo alto (FICKERS et al., 2004).

Dentre todas as fontes de nitrogênio orgânico testadas, o hidrolisado ácido, exclusivamente composto por aminoácidos livres, mas, pobre em triptofano, rendeu baixa produção de lipase, enquanto os outros hidrolisados de caseína, mas, enzimáticos, propiciaram alto rendimento de produção. Fickers et al. (2004) sugerem que peptídeos específicos presentes nos hidrolisados enzimáticos podem regular a produção lipásica.

2.4.3 Resíduo da Desodorização de Óleos Vegetais

A expansão do uso de óleos vegetais no Brasil aconteceu nos anos 70, principalmente com o óleo de soja, com o interesse crescente da indústria refinadora de óleos e demanda do mercado internacional. Desde então, as indústrias de óleos vegetais vêm se fortalecendo com tecnologias de processamento que conferem ao óleo características apropriadas para o consumo humano (TOPALLAR, 1998).

Atualmente, cerca de 80% dos óleos vegetais são usados em alimentos, incluindo os óleos para saladas, frituras, maioneses e margarinas. Os 20% restantes são dirigidos para aplicações industriais na produção de detergentes, cosméticos, lubrificantes, tintas, vernizes e plásticos (HATJE, 1989).

Óleos vegetais brutos são constituídos por mais de 95 % de triacilgliceróis e por compostos minoritários como fosfolípidios, traços de carboidratos, ácidos graxos livres e produtos de degradação dos ácidos graxos. Além disso, na fração correspondente à matéria insaponificável, estão presentes os esteróis, tocoferóis, carotenóides, hidrocarbonetos e ceras.

Logo, torna-se necessário submeter o óleo bruto ao processo de refino para que o mesmo adquira características desejáveis (HUI, 1996).

No processo de refino, o óleo vegetal bruto é inicialmente degomado com uma quantidade limitada de água, centrifugado e então refinado para retirar os ácidos graxos livres e outras impurezas. O processo industrial de refino ocorre por etapas seqüenciais de destilação, clarificação e finalmente a desodorização que utiliza destilação por arraste de vapor a 250°C para eliminação das substâncias mais voláteis. Nesta etapa, para cada 10 litros de óleo, forma-se 1 litro de um resíduo denominado “resíduo da desodorização do refino de óleos vegetais” (OR) (HOFFMAN, 1989; RIBEIRO et al., 2005; SARIKAYA, 1994). ORs têm sido reaproveitados como matéria prima para extração de tocoferóis arrastados durante da desodorização (HOFFMAN, 1989). Estudos sobre outras utilizações colaboram com a destinação adequada deste resíduo agroindustrial produzido em abundância pelas refinarias de óleos vegetais.

2.5 ATIVIDADE LIPOLÍTICA

A lipase libera ácidos graxos do substrato devido à sua ação hidrolítica. Assim como em qualquer reação enzimática, a atividade lipásica pode ser determinada direta ou indiretamente, pelo consumo do substrato ou pela formação dos produtos, ou seja, liberação de ácidos graxos. Geralmente, a atividade lipásica é determinada pela dosagem do produto formado (ácido graxo) durante um tempo de incubação definido da enzima com o substrato. Os ácidos graxos produzidos pela hidrólise dos triglicerídeos podem ser quantificados por métodos titulométricos, colorimétricos, turbidimétricos ou fluorimétricos (OLIVEIRA, 2000; COLEN, 2006).

2.5.1 Ensaio em Placa de Petri (Seleção de microrganismos)

A atividade lipásica pode ser detectada em placas de Petri, empregando-se um substrato lipídico incorporado ao gel de agar-agar que contenha um corante indicador (que reage com os ácidos graxos formados) ou em meio que permita visualizar halo transparente de

lipólise (meio opaco). A atividade pode ser detectada em meios de cultura onde colônias de microrganismos produtores de lipase se desenvolvem ou em gel de agar, contendo, apenas, o substrato na presença de tampão apropriado e em condições de detecção do halo. No último caso, após a solidificação do gel, fura-se pequenos poços, onde é adicionada uma certa quantidade da preparação enzimática. Após incubação na temperatura desejada a lipólise faz com que seja formado um halo, região mais clara, ao redor do poço, devido aos ácidos graxos livres (REED, 1975).

Segundo Sandoval e Marty (2007), ensaios em placa de Petri são mais sensíveis e permitem que seja realizada uma dosagem quantitativa e direta, mesmo que haja uma baixa quantidade de lipase. Os óleos vegetais emulsionados são os substratos de escolha para as lipases, apesar da tributirina também ser utilizada, já que é substrato para outras esterases, sendo mais empregadas em programas de seleção de microrganismos produtores de lipases (CARDENAS et al., 2001; COLEN, 2006).

2.5.2 Método Titulométrico

O método mais comum de determinação da atividade de lipases em um ensaio enzimático é pela titulação de ácidos graxos, liberados pela hidrólise de triglicerídeos de um óleo sob a forma de uma emulsão, obtida com goma arábica, carboximetil celulose ou álcool polivinílico como emulsificantes (SCHIMIDT et al., 2005 apud COLEN, 2006). A atividade enzimática da lipase é definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 micromol de ácido graxo livre da emulsão de óleo por minuto, nas condições do teste - concentração de substrato, em excesso; pH tamponado; temperatura e tempo de reação (HADEBALL, 1991).

Segundo Reed (1975), uma unidade de lipase fúngica pode ser definida como a quantidade de enzima que produz ácidos graxos equivalentes a 1 mL de solução de KOH 0,05M, dadas as condições experimentais (óleo de oliva, como substrato; concentração do substrato de 15%; tempo de reação 150 minutos; pH 5,6; temperatura, 30°C). Essa definição é arbitrária, podendo ser escolhidas diferentes condições da reação e diferente molaridade da solução alcalina tituladora. Na maioria das vezes um autor padroniza as condições de seus experimentos que podem diferir bastante de um autor para outro. Lipases podem ser determinadas com vários substratos (óleo de oliva, glicerídeos sintéticos), com

óleos emulsionados ou não emulsionados, em vários valores de pH, e diferentes tempos. Algumas vezes metodologias similares são usadas, mas com pequenas variações que interferem na determinação do resultado (REED, 1975). A atividade lipásica também depende da solução tampão a ser usada. Maiores atividades foram observadas quando se utilizou tampão fosfato ao invés de tampão fosfato citrato ou Tris-HCl (LIMA et al., 2004a). As emulsões de óleo de oliva preparadas com solução de álcool polivinílico conservam-se completamente homogêneas durante o ensaio e podem ser usadas na determinação da atividade lipásica (WATANABE et al.; 1977).

2.5.3 Método de Hidrólise do *p*-nitrofenol

A utilização de substratos cromogênicos para determinar a atividade de lipases tem sido largamente empregada para o monitoramento da produção de lipases durante os estudos, por ser de fácil e de rápida execução e utilizar quantidades reduzidas tanto de substrato como da amostra em análise. Porém, como este método detecta tanto a ação de esterases como de lipases, recomenda-se a confirmação em momentos estratégicos do estudo, a presença de lipases verdadeiras, através do método titulométrico acima descrito.

Este método foi inicialmente descrito por Winkler e Stukmann (1979), sendo modificado por Lima (2004a). Baseia-se na hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila (Figura 9) pela enzima, em meio aquoso contendo como surfactantes a goma arábica e o Triton X-100. A formação do *p*-nitrofenol (produto de hidrólise), de coloração amarela é quantificada a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a liberação de 1 μmol de *p*NP (*p*-nitrofenol) por minuto. A atividade enzimática é calculada a partir do coeficiente de absorvidade molar do *p*-nitrofenol, obtido a partir de uma curva de calibração do *p*-nitrofenol nas mesmas condições do ensaio. Além do palmitato de *p*-nitrofenila, existem no mercado muitos produtos a base de *p*-nitrofenol, que tem a mesma ação que o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP). O coeficiente de extinção molar do *p*NPP em pH 7,0 ($9,78.10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi utilizado para relacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura de cada amostra.

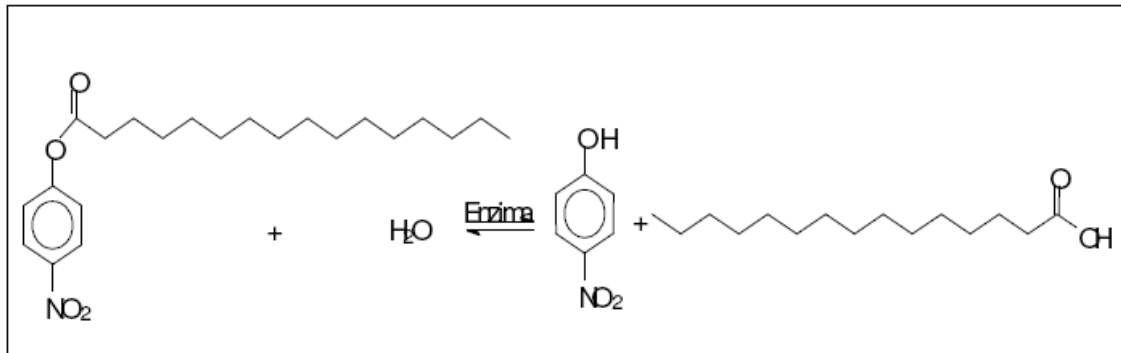


Figura 9 – Reação de hidrólise do *p*NPP.

2.6 APLICAÇÕES DAS LIPASES

As lipases são enzimas que vem se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia. Devido a sua grande versatilidade, as lipases catalisam reações de hidrólise e de síntese e podem ser aplicadas em muitos setores industriais, principalmente as lipases de origem microbiana, conforme ilustra a Tabela 1 (FREIRE; CASTILHO, 2008).

Tabela 1 – Aplicações industriais de lipases microbianas.

<i>Indústria</i>	<i>Ação Catalítica</i>	<i>Produto ou Aplicação</i>
Detergentes	Hidrólise de gordura	Remoção de manchas de óleo em tecidos
Laticínios	Hidrólise de gordura, amadurecimento de queijo	Desenvolvimento do sabor em leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhoria do sabor	Prolongamento do tempo de prateleira
Bebidas	Melhoria do aroma	Bebidas
Molhos	Melhoria da qualidade	Maionese, molhos e coberturas
Suplementos alimentares	Transesterificação	Alimentos especiais
Frigoríficos	Desenvolvimento do sabor	Derivados de carne e peixe, remoção de gordura
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau. Margarina, glicerol, mono-e diglicerídeos
Produtos químicos	Enantiosseletividade, síntese	Intermediários quirais, produtos químicos
Produtos farmacêuticos	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais, auxiliares digestivos

Cosméticos	Síntese	Emulsificantes, hidratantes
Couro	Hidrólise	Produtos de couro
Papel	Hidrólise	Papel de melhor qualidade
Produtos de limpeza	Hidrólise	Remoção de gordura

Fonte: Vulfson (1993); Faber (2000).

As lipases assim como outras enzimas microbianas, também podem ser usadas nos processos de biotransformação (Figura 10), pois, representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo custo, agem em vários tipos de substratos, possuem ampla disponibilidade, e condições suaves de síntese (FABER, 1997).

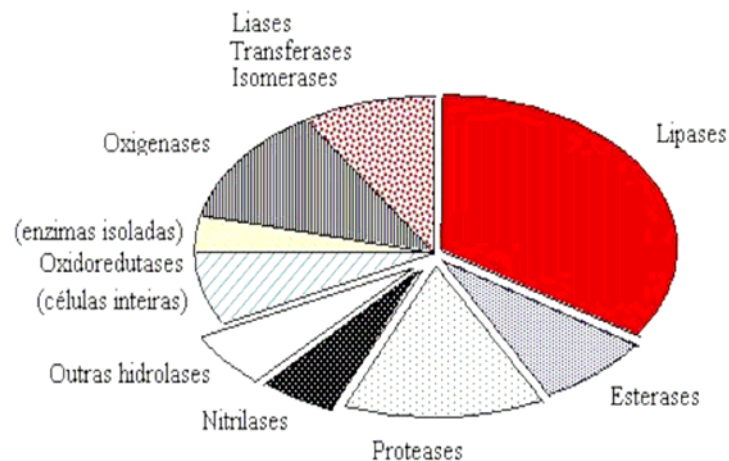


Figura 10 – Uso de enzimas microbianas em processos da biotransformação

Fonte: Faber, (1997 apud FREIRE; CASTILHO, 2008).

2.6.1 Indústria de Alimentos

As lipases são empregadas na industrialização de alimentos para obtenção de ácidos graxos livres por hidrólise seletiva dos óleos e gorduras presentes em diversos alimentos. Dependendo da cadeia de carbonos e do grau de insaturação, os ácidos graxos obtidos conferem aos alimentos um peculiar sabor e aroma, apresentando um papel

importante nas propriedades físico-químicas, organolépticas e nutricionais de diversos produtos (JAEGER, REETZ, 1998).

Na produção de salsichas fermentadas, a aplicação das lipases de *Rhizomucor miehei* tem aspectos econômicos positivos, porque reduz o tempo de maturação, com manutenção das características analíticas e sensoriais (RATHI; SAXENA; GUPTA, 2001).

Lipases 1,3-específicas são empregadas na hidrólise de triglicerídeos para a obtenção de monoacilglicerídeos, que são utilizados como emulsificantes, não só na indústria alimentícia, mas também na indústria de cosméticos e farmacêuticos (JAEGER et al., 1994; MONTEIRO; NASCIMENTO; NINOW, 2003; PIAO et al., 2003; SILVA et al., 2005).

2.6.2 Indústria de Detergentes

O emprego de lipases como componente funcional na formulação de detergente é responsável pela venda de cerca de 1 000 toneladas de lipases por ano ou cerca de 32% das vendas totais de lipases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). As principais características necessárias a esta finalidade são a estabilidade nas condições de lavagem (pH entre 10 e 11 e temperaturas entre 30 e 60°C), a resistência aos componentes da formulação (como alquilbenzenossulfonados e proteases) e baixa especificidade pelo substrato, isto é, a capacidade de catalisar a hidrólise de óleos e / ou gorduras de composições distintas. Enzimas que têm estas características são obtidas através de uma combinação de lipases de diferentes fontes (CARDENAS et al., 2001) e da aplicação da engenharia de proteínas (AKOH et al., 2004; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; FREIRE; CASTILHO, 2008).

2.6.3 Indústria de Óleos e Gorduras

O emprego de lipases na indústria oleoquímica, reduz gastos com energia e minimiza a degradação térmica dos compostos em comparação às vias químicas tradicionais (ARBIGE; PITCHER, 1989).

A modificação enzimática de óleos que contém alto percentual de ácidos graxos insaturados (PUFAs, *poly-unsaturated fatty acids*) é um processo com excelentes perspectivas comerciais, porque os PUFAs se decompõem facilmente no processo por via química gerando produtos de oxidação e polímeros indesejáveis (AKIMOTO et al., 2003). Devido a seus efeitos metabólicos benéficos, os PUFAs são muito utilizados como fármacos, produtos dietéticos, nutracêuticos e aditivos alimentares. Um exemplo é um produto dietético destinado a recém-nascidos prematuros, produzindo por interesterificação enzimática de tripalmitina com ácido oléico, gerando triacilgliceróis que contém, na posição 2, o ácido palmítico, um componente facilmente absorvido, que é encontrado no leite humano (SCHMID; VERGER, 1998).

2.6.4 Indústria de Fármacos e Química Fina

As indústrias farmacêuticas e de química fina vêm utilizando cada vez mais as lipases em seus processos produtivos. As características de régio, enantio e quimiosseletividade das lipases permitem a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos. Além disso, essas enzimas apresentam, em geral, excelente estabilidade na presença de solventes orgânicos, nos quais os substratos dessas reações são solúveis (GHANEM; ABOUL-ENEIN, 2004; GOTOR-FERNÂNDES; BRIEVA; GOTOR, 2006).

Muitos dos fármacos utilizados no combate à doença de Alzheimer têm como intermediário o (*S*)-2-pentanol. Para obter este enantiômero, existem várias lipases disponíveis comercialmente que apresentam enantiosseletividade para a resolução do 2-pentanol racêmico, porém a lipase B de *Candida antarctica* parece ser a mais indicada (NOËL et al., 2004; PATEL, 2001).

Bevilaqua et al. (2004) estudaram a hidrólise quimiosseletiva de um precursor de um fármaco antiasmático (um éster ftalimídico), empregando uma lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM), e obtiveram 98% de conversão ao ácido correspondente. Chinsky et al. (1989 apud FREIRE; CASTILHO, 2008) investigaram a modificação regiosseletiva de compostos orgânicos polifuncionais, como vistas ao tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), entre outros.

As lipases são também utilizadas na produção de antidepressivos, anti-hipertensivos e vasodilatadores (GOTOR-FERNÂNDES; BRIEVA; GOTOR, 2006). A esterificação de ácido 2-clorobutírico com 1,2-epóxi-5-hexeno catalisada por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM) foi estudada por Garcia et al. (1998), para a produção de um éter intermediário da síntese de taxol, um fármaco anticâncer, alcançando conversões de até 85%, dependendo das condições experimentais utilizadas.

Na área de Química Fina, a empresa alemã BASF desenvolveu um processo que emprega a lipase de *Burkholderia plantarii* imobilizada em poliacrilato, para a produção de (*R*)-feniletilmetoxiamida em uma escala superior a 100 toneladas por ano, com rendimentos superiores a 90%. Este composto é um intermediário para a obtenção de fármacos e pesticidas (LIESE; SEELBACH; WANDREY, 2006).

Slotema et al. (2003) descreveram um processo economicamente viável de produção contínua de oleamida, um agente lubrificante, via amidação do ácido oléico com amônia, catalisada pela lipase de *Candida antarctica* em 2-metil-2-butanol. Calculou-se uma produtividade de 4,5 toneladas/ano de oleamida por quilograma de enzima, indicando uma contribuição da enzima no custo do processo de apenas 4% .

2.6.5 Tratamento de Efluentes

O tratamento de efluentes de diversas origens é uma área nova e crescente de atuação de lipases. As lipases de *Candida rugosa* já foram utilizadas no tratamento de resíduos domésticos e na limpeza de tubulações de esgoto, fossas sépticas e sumidouros (JAEGER, REETZ, 1998) e em efluentes de restaurantes (DHARMSTHITI; KUHASUNTISUK, 1998). As lipases também são utilizadas para acelerar a biodegradação de lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (ALIPHAT et al., 1998).

Foram utilizadas lipases de *Penicillium restrictum*, produzidas por fermentação no estado sólido, no pré-tratamento enzimático de efluentes ricos em gorduras, oriundos da indústria de laticínios e de abatedouros. Elas foram utilizadas com sucesso em processos híbridos de tratamento enzimático / biológico dos tipos anaeróbico e aeróbico (CAMMAROTA; TEIXEIRA; FREIRE, 2001; FREIRE et al., 2002; JUNG; CAMMAROTA; FREIRE, 2002; LEAL et al., 2002; ROSA; CAMMAROTA; FREIRE, 2006). Em todos estes

trabalhos, a obtenção das enzimas por estado sólido proporcionou custos de produção muito inferiores aos obtidos por fermentação submersa (CASTILHO et al., 2000). O baixo custo é uma premissa indispensável para o emprego de enzimas no tratamento de rejeitos (CAMMAROTA; FREIRE, 2006; FREIRE; CASTILHO, 2008).

2.6.6 Produção de Biodiesel

Uma área que ganhou relevância nos últimos anos é o emprego de lipases na produção de biodiesel, através da transesterificação de triglicerídeos com alcoóis de cadeia curta. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia longa produzidos na reação podem ser empregados como combustível, com a vantagem de não ocorrer a geração de óxidos de enxofre e de particulados (ISO et al., 2001).

Diversas lipases e óleos vegetais, como óleos de mamona, de girassol e de soja, estão em testes como substrato para a reação de transesterificação (AL-ZUHAIR, 2005; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Oliveira et al. (2004) investigaram o emprego de duas diferentes lipases comerciais em meio orgânico contendo *n*-hexano. Através de planejamento estatístico de experimentos, os autores estudaram a influência da razão molar óleo/álcool, da temperatura e das concentrações de enzima e de água sobre a conversão, a qual atingiu o nível máximo de 98% quando uma enzima comercial de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme® IM) foi usada (FREIRE; CASTILHO, 2008).

Noureddini et al. (2005) compararam o desempenho de 9 diferentes lipases na transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol. Os maiores rendimentos foram obtidos com a lipase PS de *Pseudomonas cepacia*, que foi então imobilizada em um suporte sol-gel hidrofóbico e quimicamente inerte. Desta forma, os autores obtiveram um biocatalisador de elevada estabilidade, que proporcionou rendimentos elevados em reduzidos tempos de reação (apud FREIRE; CASTILHO, 2008).

2.6.7 Outras Aplicações

As lipases podem ser empregadas como biossensores para a detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (LAPENAITE; RAMANAVICIENE; RAMANAVICIUS, 2006; VAN VELDHOVEN et al., 1997). A indústria de cosméticos e de perfumes utiliza lipases na produção de aromas e de surfactantes, além de emolientes usados em cremes para a pele e creme bronzeadores (SAXENA et al., 1999). Em conjunto com outras hidrolases, as lipases podem, ainda, ser empregadas na manufatura de tecidos de algodão (SANGWATANNAROJ et al., 2003) e na remoção de gordura subcutânea e pêlos na indústria de couro (PANDEY et al., 2000).

Na indústria de papel, as lipases são utilizadas em conjunto com celulasas e ligninases para a eliminação de depósitos de resinas nos cilindros de secagem, de forma a melhorar a qualidade do papel e diminuir a frequência de limpeza dos cilindros (SCHMID, VERGER, 1998). A empresa Nippon Paper Industries, indústria japonesa produtora de papéis, desenvolveu um processo de controle e remoção das resinas, utilizando lipase de *Candida rugosa* (FLEET; BREUIL, 1998).

2.6.8 Lipases e suas Perspectivas

Para tornar economicamente viável o uso de lipases como catalisadores de processos industriais, diversas técnicas podem ser utilizadas (BORNSCHEUER, 2002). Como microrganismos selvagens produzem, frequentemente, níveis baixos de enzima, uma técnica muito promissora é a evolução dirigida (ARNOLD; MORRE, 1997; REETZ, 2006). Trata-se de uma técnica baseada na metodologia tradicionalmente empregada em vários campos da microbiologia, de promover mutações em microrganismos e selecionar as cepas mutantes mais produtivas, que nos anos recentes foi automatizada (*high-throughput screening*). Através da evolução dirigida, além de cepas mais produtivas, podem ser obtidas cepas produtoras de lipases com novas especificidades ou capazes de atuar sobre substratos não-usuais (VASIC-RACKI, 2000).

Com o desenvolvimento dos conhecimentos e das técnicas associadas à biologia molecular, observa-se, cada vez mais, a tendência de expressar genes que codificam

lipases de características interessantes em microrganismos de mais fácil cultivo em larga escala. Almeida (2001) e Almeida et al. (2006) clonaram e expressaram uma lipase da arquea termofílica *Pyrococcus furiosus* em *E. coli*, e o extrato das células transformadas apresentou capacidade de hidrolisar o óleo de babaçu em 60°C e o óleo de oliva em 80°C. Liao, Mckenzie e Hageman (1986) empregaram a alternativa inversa para selecionar uma enzima termoestável oriunda de um microrganismo mesofílico, clonando-a em um termofílico e selecionando os clones capazes de reter a atividade enzimática nas condições termofílicas. Liao, Mckenzie e Hageman (1986) clonaram e expressaram uma lipase alcalina de *P. aeruginosa* ICB83 em *Xanthomonas campestris* e, após otimização das condições de cultivo da linhagem recombinante, obtiveram um aumento de 12 vezes na produção da lipase alcalina. Brocca et al. (1998) sintetizaram in vitro a seqüência que codifica a lipase I de *Candida rugosa* superexpressaram o gene sintético em *Pichia pastoris*, obtendo 150 U/mL da lipase recombinante (FREIRE; CASTILHO, 2008).

Embora estas técnicas forneçam resultados promissores no sentido de gerar lipases com características mais apropriadas a sua utilização como catalisadores de processos industriais, muitos esforços ainda são necessários para o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados, sistemas de reação multifásicos e processos de produção e purificação de lipases de menor custo (FREIRE; CASTILHO, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e investigar as características de ação e estabilidade de lipases extracelulares do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* CG432 utilizando meios de cultura suplementados com óleos e resíduos gerados do refino de óleos vegetais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação do meio de cultivo de Alves com 3% de óleo vegetal bruto de algodão, óleos vegetais refinados de oliva (OO), canola, algodão, soja e girassol; e resíduos oleosos (OR).
- Avaliar a adição dos surfactantes Triton X-100 ou Tween 80 sobre a produção de lipases em meio de Alves.
- Otimizar através da metodologia de superfície de resposta as concentrações de Triton X-100, glucose, óleo de oliva e uréia para obter alta produção de lipases com baixa biomassa em meio de Vogel.
- Determinar as condições ótimas de temperatura e pH de ação das lípases produzidas em meios de Alves e Vogel suplementados com OR e óleo de oliva, respectivamente.
- Avaliar a estabilidade de lipases produzidas em OR e óleo de oliva sob armazenamento às temperatura ambiente, de refrigeração e de congelamento, e quando incubadas sob suas respectivas condições ótimas de atividade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Utilizou-se o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* cepa CG432, isolada de insetos mortos (Hemíptero: Membracidae) região nordeste do Brasil. O fungo foi mantido em meio de ágar batata dextrose (BDA) e repicado para preparo do inóculo em meio de Alves (1998) constituído por 1,0% de glucose, 0,5% de extrato de levedura, 0,16% de NaNO₃, 0,11% Na₂HPO₄.7H₂O, 0,1% KCl, 0,06% MgSO₄.7H₂O, 0,036% KH₂PO₄.

Conídios recém crescidos em meio de Alves a 26°C durante 10 dias foram utilizados para padronizar uma suspensão contendo 10⁸conídios/mL em água destilada estéril e 0,01% do surfatante Triton X-100, utilizando a câmara de Neubauer para contagem dos conídios.

4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Os cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 25mL de salina de Vogel (1956) preparado conforme Anexo 3 ou meio de cultura líquido de Alves (1998) com mesma composição descrita acima, porém sem a adição de agar.

Os meios de cultura foram autoclavados (1 atm, 121°C durante 15 minutos). Após resfriamento em torno de 40°C, os meios foram adicionados com 0,1% de CaCl₂ e conforme o objetivo do experimento, foram distintamente suplementados com glucose, uréia, surfatantes (Triton X-100 e Tween 80), óleo vegetal bruto de algodão, óleos vegetais refinados de oliva, canola, algodão, soja e girassol; ou resíduos oleosos gerados pela desodorização, ou seja, a última etapa do processo industrial do refino de óleos vegetais. Todos os suplementos foram autoclavados separadamente.

Após inoculação com 10⁶ conídios/mL do fungo *B. bassiana* CG432, todos os cultivos foram rigorosamente agitados durante 1 minuto, e as fermentações foram conduzidas a 28°C, sob agitação a 200rpm em incubadora orbital (shaker) durante diferentes dias, conforme objetivo do experimento.

Todos os cultivos foram interrompidos a 4°C por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman No.1, seguida por centrifugação a 8000xg durante 20 minutos. Os sobrenadantes ou extratos de lipases (LE) foram dialisados contra tampão fosfato 5mM pH 7 utilizando membrana de exclusão molecular 12kDa (Sigma) e utilizados nos ensaios da atividade de lipases e determinações analíticas.

A biomassa foi quantificada por gravimetria a 80°C até peso constante e expressa em g/25mL de cultivo.

Todos os cultivos foram realizados em triplicata, acompanhados de controles estéreis (sem adição do inóculo).

4.3 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS E RESÍDUOS SOBRE A PRODUÇÃO DE LIPASES

Foram realizados cultivos de 5 dias em meio líquido de Alves adicionado de 0,1% de CaCl₂ e 0,25% dos surfatantes Triton X-100 ou Tween 80. Os meios foram suplementados com 3% de óleo vegetal bruto de algodão, óleos vegetais refinados de oliva (OO), canola, algodão, soja e girassol; e resíduos oleosos (OR).

Contaminantes oxidativos dos resíduos foram previamente removidos por passagem através de coluna de alumina neutra e mistura solvente de éter, éter de petróleo 1:10. O solvente foi removido por evaporação e a pureza dos resíduos foi avaliada por cromatografia de camada delgada em sílica gel com éter de petróleo, éter e ácido acético (70:30:2) (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974). Cultivos controle sem adição de surfatante foram realizados paralelamente.

Biomassa foi quantificada após interrupção no quinto dia dos cultivos e os LEs obtidos foram ensaiados quanto a atividade de lipases.

4.4 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LÍPASES EM ÓLEO DE OLIVA E RESÍDUO DA DESODORIZAÇÃO DE ÓLEO DE CANOLA

Foram realizadas duas curvas de crescimento em paralelo, ambas utilizando meio de cultura líquido de Alves contendo 0,1% de CaCl₂ e 0,25% de Triton X-100, porém

distintamente suplementadas com 3% de óleo de oliva (OO) e resíduo da desodorização de óleo de canola (OR).

Biomassa foi quantificada por gravimetria a 80°C até peso constante após interrupção diária dos cultivos e os LEs obtidos foram ensaiados quanto a atividade de lipases, determinação de pH e quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976), açúcares redutores (MILLER, 1959) e lipídeos (FRINGS; DUNN, 1970)

4.5 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA SIMULTÂNEA OBTENÇÃO DE ALTA PRODUÇÃO DE LÍPASES E BAIXA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA.

Foram realizados dois experimentos usando a metodologia de superfície de resposta (RSM) para definir as concentrações ótimas dos nutrientes (fatores X) para obter simultaneamente alta produção de lipases e baixa produção de biomassa (respostas Y) em culturas de *B. bassiana* durante cinco dias.

O primeiro experimento foi baseado em dados da literatura (ELIBOL; OZER, 2002) e consistiu de um delineamento fatorial incompleto (2^{4-1}) com três níveis codificados dos fatores Triton X-100 (X_1), glucose (X_2), óleo de oliva (X_3) e uréia (X_4),

O Segundo experimento foi baseado nos resultados dos testes de desejabilidade realizados no primeiro experimento e utilizou um design fatorial incompleto (2^{3-1}) com três níveis codificados dos mesmos fatores, com exceção da glucose (Tabela 2). Os resultados foram analisados por meio do Software Statistica 7.0 (Statsoft).

Biomassa foi quantificada por gravimetria a 80°C até peso constante após interrupção no quinto dia dos cultivos e os LEs obtidos foram ensaiados quanto a atividade de lipases.

Tabela 2 – Planejamentos fatoriais fracionados incompletos (2^{4-1}) e (2^{3-1}) para quatro e três variáveis independentes em dois níveis de variação (-1 e +1) e três repetições no nível central (0).

<i>Ensaio</i>	<i>Fatorial fracionado (2^{4-1})</i>				<i>Fatorial fracionado (2^{3-1})</i>		
	Triton X-100 (X₁)	Glucose (X₂)	Óleo de Oliva (X₃)	Uréia (X₄)	Triton X-100 (X₁)	Óleo de Oliva (X₂)	Uréia (X₃)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1
5	-1	-1	+1	+1	0	0	0
6	+1	-1	+1	-1	0	0	0
7	-1	+1	+1	-1	0	0	0
8	+1	+1	+1	+1	-	-	-
9	0	0	0	0	-	-	-
10	0	0	0	0	-	-	-
11	0	0	0	0	-	-	-

4.6 CURVA DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE LÍPASES NAS CONDIÇÕES INDICADAS PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Realizou-se uma curva de crescimento utilizando salina de Vogel contendo 0,1% de CaCl₂ e suplementada conforme condições otimizadas para a obtenção simultânea da alta produção de lipases e baixa produção de biomassa de acordo com a metodologia de superfície de resposta: 0,35% de Triton X-100, 0,75% de óleo de oliva e 1,5% de uréia.

Biomassa foi quantificada após interrupção diária dos cultivos e os LEs obtidos foram ensaiados quanto a atividade de lipases, determinação de pH e quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976), açúcares redutores (MILLER, 1959) e lipídeos (FRINGS; DUNN, 1970).

4.7 ENSAIO ENZIMÁTICO

Foi usado o método do substrato do *p*-nitrofenol palmitato (*p*-NPP Sigma) para determinar a atividade de lipases (WINKLER; STUCKMAN, 1979), usando tampão Tris-HCl 100mM pH 8,5 contendo 0,4% de Triton X-100 à 50°C por 2 minutos para a incubação da enzima. A atividade de lipase foi confirmada pelo método titulométrico (LIMA, et al., 2004a). Uma unidade de lipase foi definida com a detecção de 1 μ M de *p*-nitrofenol (*p*-NP) por mL de extrato, por minuto de reação e 1 μ mol de ácido graxo livre liberado por mL do extrato por hora de reação.

4.8 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

O teor de proteínas, açúcares redutores e lipídeos foram determinados pelos métodos de Bradford (1976), Miller (1959) e Frings e Dunn (1970), respectivamente. A atividade de proteases foi determinada de acordo com Ito et al. (2007).

4.9 DETERMINAÇÃO DO pH E DA TEMPERATURA ÓTIMA DA ATIVIDADE DE LIPASES

Para determinar o pH e a temperatura ótima, os extratos de lipases obtidos do 4° e 7° dias das curvas de crescimento em meios suplementados com óleo de oliva e resíduo (OR), respectivamente, foram previamente purificados por ultrafiltração (membrana cutoff 100kDa, Milipore and Stirred cell, Sigma) desde que as lipases pudessem formar agregados protéicos com massa molar maior que 80kDa em soluções aquosas ou de sais (CASTRO-OCHOA, 2005), obtendo-se extratos de lipases ultrafiltrados (UFLE), que foram ensaiados pela hidrólise do *p*-NPP em temperaturas de 20 a 60°C e usando diferentes tampões a 50mM: acetato (pH 3,5 a 6,0), fosfato de sódio (pH 6,0 a 7,5), Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0) e fosfato de sódio NaOH (pH 9,0 a 12,0).

4.10 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE LIPASES EM ESTOCAGEM E CONDIÇÕES ÓTIMAS

A estabilidade das lipases produzidas em óleo de oliva e resíduo OR parcialmente purificadas (UFLEs) foi determinada pelos métodos titulométrico e hidrólise da emulsão do *p*-NPP em alíquotas pré-incubadas à temperatura ambiente ($25\pm 5^{\circ}\text{C}$), congelamento em freezer ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) e em geladeira (18°C) por vários dias. A estabilidade destas lipases foi determinada nas condições ótimas de temperatura e pH por várias horas: 45°C e pH 8,5 para as lipases produzidas em óleo de oliva e $40, 45, 50$ e 55°C e pH 8,5 para lipases em resíduos oleosos (OR).

4.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NaCl SOBRE A ATIVIDADE DE LIPASES

Alíquotas de UFLE obtidas dos cultivos suplementados com resíduo OR foram ensaiadas pelo método da hidrólise do *p*-NPP a 55°C e pH 8,0 usando tampão TRIS-HCl contendo 0,1, 0,2, 0,4, 1,0 e 2,0M de NaCl.

Todas as etapas do processo de produção de lipases estão representadas na Figura 11.

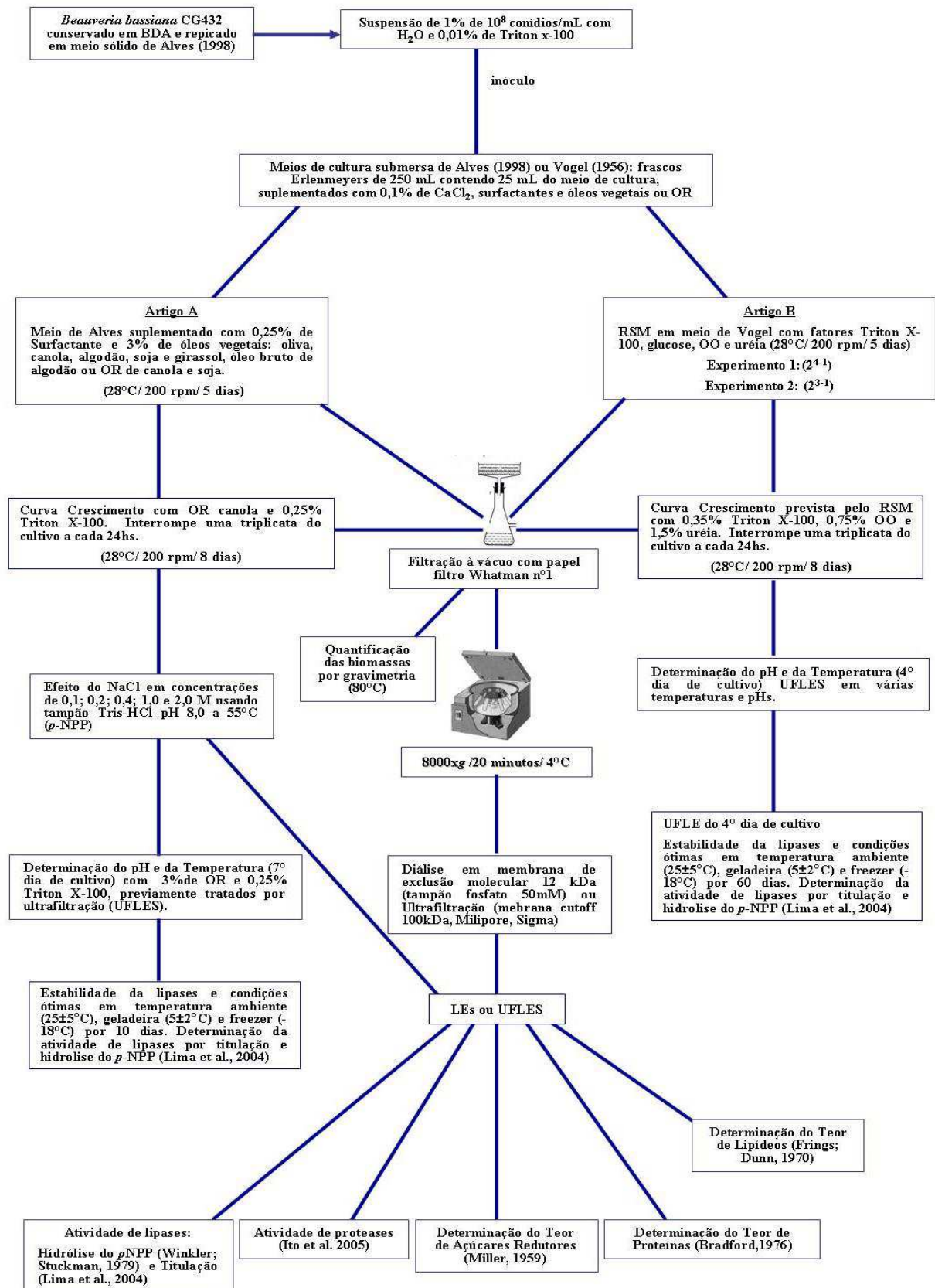


Figura 11 – Etapas do processo de produção de lipases pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* CG432.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram apresentados sob forma de artigos científicos que serão submetidos para publicação na revista *Process Biochemistry*, os quais se encontram listados abaixo:

O primeiro artigo (*Production and some characteristics of a lipase in submerged fermentation supplemented with only residue by Beauveria bassiana*) tem como objetivo produzir e investigar algumas propriedades da atividade de lipases extracelulares produzidas por *B.bassiana* CG432 em meio de Alves suplementado com resíduo agroindustrial do processo de refino de óleos vegetais.

O Segundo artigo (*Silmultaneous high lipase and low biomass production in submerged cultivation of Beauveria bassiana*) tem como objetivo avaliar as concentrações necessárias de nutrientes através da metodologia de superfície de resposta (RSM) para obter simultaneamente alta produção de lipases e baixa biomassa em cultivos de *B.bassiana* CG432. O tempo de cultivo, consumo dos nutrientes e algumas características da atividade e estabilidade enzimática, também foram observados.

5.1 ARTIGO A

PRODUCTION AND SOME CHARACTERISTICS OF A LIPASE IN SUBMERGED FERMENTATION SUPPLEMENTED WITH OILY RESIDUE BY *Beauveria bassiana*

Michele Cristina Barreto da Cruz; Geni da Silva Varéa

PRODUCTION AND SOME CHARACTERISTICS OF A LIPASE IN SUBMERGED FERMENTATION SUPPLEMENTED WITH OILY RESIDUE BY *Beauveria bassiana*

Michele Cristina Barreto da Cruz; Geni da Silva Varéa^{1*}

Abstract

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* CG432 produced an extracellular lipase on the 7th day of fermentation in Alves broth containing 0.25% Triton X-100 and Tween 80 surfactants, and 3.0% olive oil at 28°C and 200rpm. Optimal temperature and pH conditions for lipase activity were found to be range from 40 to 60°C and pH 7.5 and 8.0 using 50 mM Tris-HCl buffer, verified by a hydrolysis *p*-nitrophenol palmitate assay. Under these conditions, lipase was 50% stable for approximately 10h, however it was stable for up to 10d ays (-18°C), refrigerated (4°C) or kept at room temperature (25°C).

Keywords: *Beauveria bassiana*. Lipase production. Vegetable oil. Oily residue. Deodorizing.

1 INTRODUCTION

Lipases (EC.3.1.1.3, triacylglycerol acilhidrolases) have been used to catalyze the hydrolysis of triacylglycerides to glycerol, mono, diacylglycerides and free fatty acids. Thus, they have been used as an important industrial biotechnological agent (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001), like in treatment of wastewater with high oil and grease content (CAMMAROTA; FREIRE, 2006) or to degumming refine of vegetable oils (YANG et al., 2006). Microbial enzymes are more useful than enzymes derived from plants or animals because of the great variety of catalytic activities available, the high yields possible, ease of genetic manipulation, regular supply due to absence of seasonal fluctuations and rapid growth of microorganisms on inexpensive media (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Lipases have been produced by submerged and state solid fermentation using many vegetable oils (JONES; PORTER, 1998), using oil-related substrates (WANG; XU; SHAN, 2008) like neem oil (GULATI, 2005) and residue from the babassu oil industry

¹ Biochemistry and Biotechnology Department State University of Londrina (UEL) Caixa PO Box 6001, CEP 86051-990, Londrina-PR, Brazil *Corresponding author at Biochemistry and Biotechnology Department, State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid PR445 Km 380, Jardim Perobal. Caixa Postal 6001, CEP 96051-990, Londrina – PR – Brazil. E-mail address gpvarea@uel.br

(GUTARRA et al., 2007). Research on newer substrate and producer microorganisms is very important to development of lipase applications.

Crude vegetable oils are constitute of triglycerides 95% and other lipids classes as phospholipids, free fatty acids, steroids, tocopherols, carotenóides, hydrocarbons and waxes. The last industrial refine stage removes some volatile compounds of oils by deodorization using steam stripping at 2 to 8 mmHg pressure, at temperature from 220 to 250°C to obtain desirable sensorial characteristics of flavor for use of the refined oils on food (O'Brien, 1998). However, each of 10 liters of deodorized oil is collected 1 liter of an oily residue (OR) and it is constitute of high free fatty acids, triacylglycerol, remain phospholipids of degumming crude oil and tocopherols (SARIKAYA, 1994; HOFFMAN, 1989). ORs have been used as raw material to tocopherols extraction, but (HUI, 1996).

Entomopathogenic fungus *B. bassiana* produced high lipases concentration on supplemented media with vegetable oils (HEGEDUS; KHACHATOURIANS, 1988). Proteases, chitinases and lipases are produced by these fungi have been focus on biological control of plagues, since hydrolysis of exoskeleton during the fungal infection process (ALVES, 1998, TANADA, 1993).

The objective of this work was to produce and to investigate some activity properties of extracellular lipases produced by *B. bassiana* CG432 on Alves broth supplemented with oily residue from agroindustrial edible vegetable oils refine process.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Fungal and inoculum ativation

Beauveria bassiana strain CG432 isolated from dead insects (Hemiptera: Membracidae) in Rio Grande do Norte State, Brazil was maintained on potato dextrose agar (PDA) and subcultured during 10 days on a complex solid medium optimized by Alves (1998) containing % (w/v): 1.0g anhydrous glucose, 0.5g yeast extract, 0.158g NaNO₃, 0.105g Na₂HPO₄·7H₂O, 0.1 KCl, 0.06g MgSO₄·7H₂O, 0.036g KH₂PO₄, and 2g agar. Suspensions of fresh conidia (water and 0.01% Triton X-100) were used to obtain 10⁶ conidia ml⁻¹ on all cultivations.

2.2 Grown conditions on vegetable oils and oily residues (OR)

Submerged cultivations were performed in 25mL (Erlenmeyer flaks 250ml) of the liquid medium described above, but without agar (Alves broth). Triplicate of cultivations were supplemented with 3% olive, canola, cottonseed, soybean or sunflower refined oils; crude cottonseed oil; and oily residues (OR) from soybean or canola refinery. The ORs were pretreated with 10% of silica until neutral pH. Broths were autoclavated (1 atm, 121C during 15 min) and after cooling they were added of 0.1% CaCl₂ and 0.25% Triton X-100 or Tween 80 surfactants autoclaved separately. All cultures were agitated vigorously and incubated at 28°C and 200rpm (shaker). Triplicate of controls without surfactants and sterile controls (without inoculum) were performed parallel. At five day, the cultivations were interrupted by filtration through paper filter Whatman No.1 and centrifugation at 8000xg for 20 min, both at 4°C. The supernatants or lipase extracts (LE) were dialyzed against 5mM phosphate buffer at pH 7 using 12kDa cut off membranes (Sigma) and assayed for lipase activity. The biomass collected on paper filter was washed three times using 100ml of distilled water and dried at 80°C until a constant weight by gravimetric method.

2.3 Grown curve on OR from canola

The growth curve of *B. bassiana* CG432 and time course of lipase production were obtained by cultivation like described above but using only OR from canola and Triton X-100 during eight days. At each 24 hours a triplicate cultivations were interrupted and the LEs were assayed for lipase activity, pH and analytical determinations.

The biomass collected on paper filter was washed three times using 100ml of distilled water and dried at 80°C until a constant weight by gravimetric method.

2.4 Lipase assay

The substrate *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP, Sigma) was used for most of the lipase activity determination (LIMA et al., 2004b), but with a 100mM TRIS-HCl pH 8.5 buffer containing 0,4% Triton X-100 at 50°C for 2 min. Lipase activity was confirmed by the titrimetric method (WINKLER; STUCKMANN, 1979) only on stability tests. One Unit of lipase activity was 1μM pNP ml⁻¹ min.⁻¹ and 1μmol free fatty acid ml⁻¹ 12h⁻¹ liberated, respectively.

2.5 Analytical determinations

Protein, reducing sugar and lipids contents were determined by Bradford (1976), Miller (1959) and Frings and Dunn (1970) methods, respectively.

2.6 Optimum temperature and pH determination of lipase

LE obtained on the 7th day of cultivation supplemented with 3% OR from canola oil and 0.25% Triton X-100 were six time concentrated and diafiltered by ultrafiltration (Stirred cell Sigma) using polyethersulfone cut off 100kDa membrane (Millipore), since lipases can form molecular mass aggregates greater than 80kDa on salt solutions (CASTRO-OCHOA, 2005). This was called ultra filtrate lipase fraction (UFLE) and was assayed for the hydrolysis of *p*-NPP from 20 to 60°C using the following pH buffers: sodium acetate (3.5 to 5.5), sodium phosphate (6.0 to 7.5), TRIS-HCl (8.0 to 9.0) and sodium phosphate NaOH (9.5 to 12.0) at 55°C.

2.7 Lipase stability in storage and at optimal activity conditions

UFLE as described above was assayed by the *p*-NPP emulsion hydrolysis method after having been stored at room temperature (25±5°C), under refrigeration (5±2°C) and frozen (-18°C) for 10 days. When preincubated at optimal temperature and pH conditions (55°C and TRIS-HCl 50mM buffer pH 8.0), it was assayed by *p*-NPP emulsion hydrolysis and titrimetric methods for 6 hours.

2.8 Effect of NaCl concentration on lipase activity

UFLE as described above was assayed by the *p*-NPP emulsion hydrolysis method at 55°C and pH 8.0 using TRIS-HCl buffer containing 0.1, 0.2, 0.4, 1.0 and 2M of NaCl.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Lipase production on oils and oily residues (OR)

Lipase production by *B. bassiana* CG432 was greater on fermentations supplemented with refined olive and canola oils than others oils (Table 1). These results can be related with the specific action of lipases on triglycerides formed of free fatty acids with long chain and one insaturated like oleic acid (C18:1) that constitute around 80.3 and 60.9 % of olive and canola oil, and only 18.6, 23.3 and 18.7% of cottonseed, soybean and sunflower, respectively (O'BRIEN, 1998). Hegedus and Khachatourians (1988) obtained higher lipase production by *B. bassiana* cultured on media containing oleic acid than the saturated free fatty acids palmitic and estearic acids.

OR from canola pretreatment with neutral alumina showed to be a good substrate to production of lipases by *B. bassiana*, since the lipase activity was 168.93 U ml⁻¹, or 72.63% of the greatest activity produced on olive oil (Table 1). This result sustains the discussion about the positive effect of the unsaturated free fatty acids on lipase production, because this OR is a concentrate of free fatty acids stripped during the deodorizing of from canola oil (O'BRIEN, 1998). These results differ of some works where any free fatty acids were inhibitor factors, but agree with others that obtained stimulation effects of those with at least one unsaturation on the long chain carbon (18:0) to produce lipases. A despite of lipases require no cofactors, Ca²⁺ ions help an important role because they form Ca²⁺-fatty acids complex to avoid change on interfacial pH (BROCKERHOFF; JENSEN, 1974).

The use of surfactant Triton X-100 increased lipase production when compared with fermentations added of Tween 80 or without surfactants, but not increased the biomass production on fermentations supplemented with crude oils or ORs (Table 1). Silva et al. (2005) had demonstrated the greatest lipase activities when SDS and Tween 80 were added after 50h of the inoculation with *M. anisopliae*, probably related with increase permeability of cell membranes and consecutive greater secretion of lipase and to avoid toxics effects on the germination or growth of fungus. According Rocha (1999), surfactants non-ionic like Triton X-100 and gum arabic are the most used to assay and to produce lipases.

Table 1 – Production of lipases by *Beauveria bassiana* CG432 in Alves broth, 0.1% CaCl₂, 0.25% surfactants and supplemented with 3% vegetable oils and oily residues pretreated with neutral alumina (OR).

Vogel supplementation	Lipase activity ^a (U ml ⁻¹) ^b			Biomass (g 25ml ⁻¹)	
	Without surfactant	Triton X-100	Tween 80	Triton X-100	Tween 80
Olive oil	7.52	229.11	84.44	0.423	0.180
Canola oil	9.86	232.60	75.30	0.920	0.236
Cottonseed oil	5.60	130.94	52.40	0.645	0.247
Soybean oil	3.16	120.45	ND	1.067	0.323
Sunflower oil	0.17	81.33	38.70	0.687	0.199
Crude cottonseed oil	ND ^c	14.02	ND	0.170	0.170
OR from canola oil	3.66	168.93	27.03	0.195	0.180
OR from soybean oil	0.62	18.16	ND	0.130	0.124

^aMeans of triplicate of cultivations and ^bassay lipase by hydrolysis *p*-NPP method

U ml⁻¹ was defined as µg *p*-nitrophenol

All cultures were inoculated with 10⁶conidia ml⁻¹ and performed at 28°C, at 200rpm during 5 days.

^cND not detected

3.2 Lipase production and fungal growth

B. bassiana CG432 cultured on Alves broth added of CaCl₂ 0.1% and olive oil 3% showed higher biomass production (Figure 1a), maximum lipase production (Figure 1b) and the reducing sugar was exhausted (Figure 1c) on 5th and 7th days of the fermentations supplemented with olive oil (OO) and oily residue from canola (OO), respectively. On these days, the variations of pH reduced to 5.5 and 5.0 (Figure 1c), but the protein content was relatively constant during both fermentation time (Figure 1d). These results demonstrated the initial use of the disposable nutrient (glucose) to fungal growth followed of lipase production to use the lipids sources added at the fermentations.

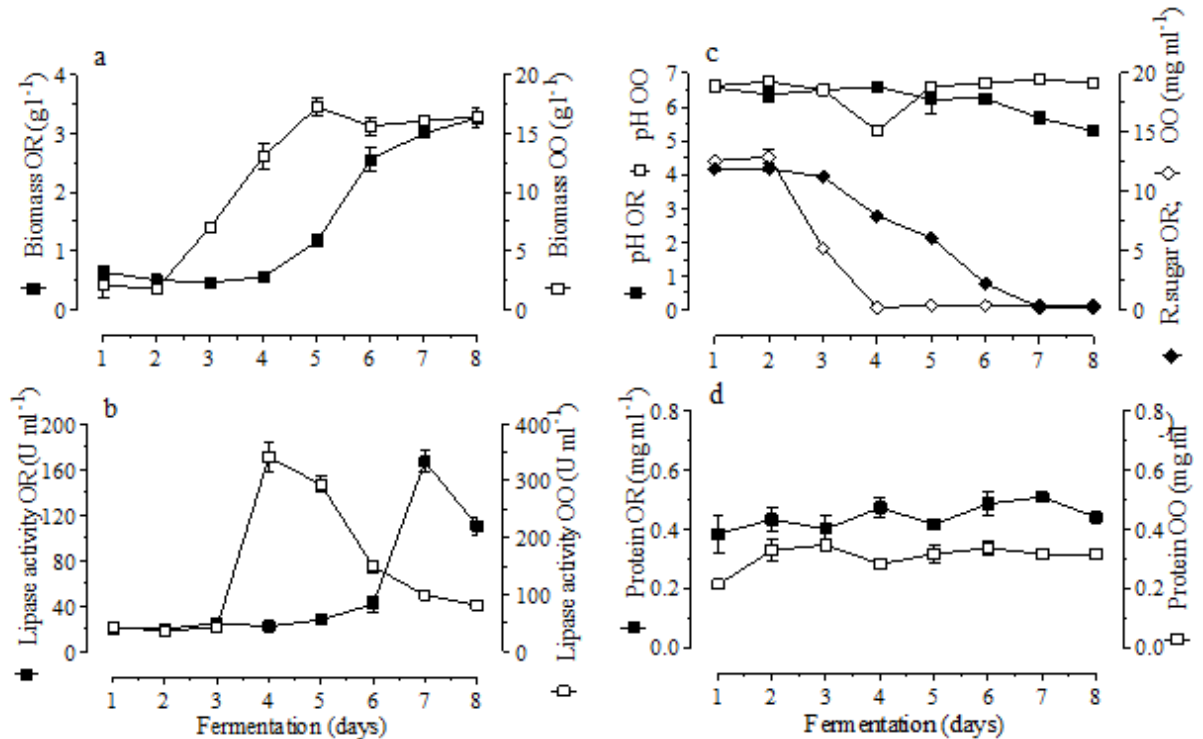


Figure 1 – Growth curve (a), time course of lipase production (b), pH variations and reducing sugar concentration (c), and protein concentration (d) in fermentation by *Beauveria bassiana* CG432 in Alves broth supplemented with 3% refined olive oil (OO) (□ open symbols) or oily residue (■ closed symbols) from industrial process deodorization (OR) of vegetable oils refinery. Alves broth was added of CaCl₂ 0.1%, inoculated with 10⁶ conidia ml⁻¹ and was performed at 28°C at 200rpm.

The optimal activities of lipases produced by OR from canola supplementation were found at range temperature from 40 to 60°C, and 7.5 and 8.0 pH (Figure 2), like the majority of other lipases, and they were stable during 10 hours and 10 days when incubated at the optimum conditions (Figure 3). The optimal temperature and pH conditions were very similar than a lipase produced by the same strain *B. bassiana* CG 432 on olive oil, but they were presented shorter stability characteristics at storage and optimum conditions than the same work (CRUZ et al., 2009).

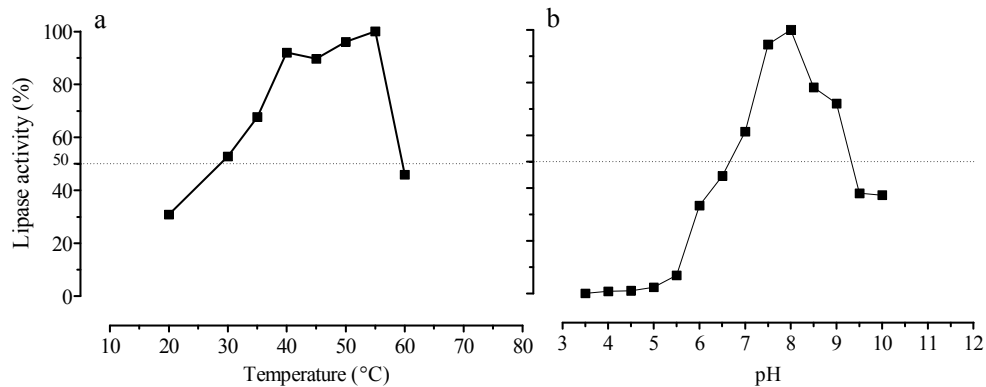


Figure 2 – Characteristics of ultra filtrate lipase extract produced by *Beauveria bassiana* CG432. (a) Incubation at 10 to 65°C, (b) pH sodium acetate at pH 3.5 to 6.0, sodium phosphate at pH 6.0 to 7.5, TRIS-HCl at pH 7.5 to 9.0, and sodium phosphate NaOH at pH 9.0 to 10.0. (c) Stability of lipases incubated in frozen at -20°C (●), room temperature at 25°C (○) and refrigerated at 4°C (▲) over 60 days; at optimal activity conditions at 45°C and pH 8.5 assayed for *p*-NPP emulsion hydrolysis (□) and titrimetric method (■) by during 60 hours.

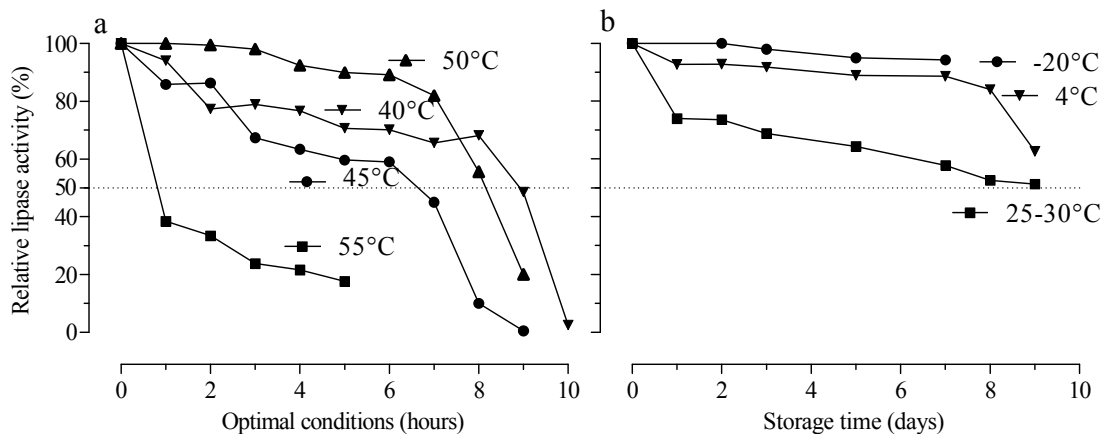


Figure 3 – Stability of ultra filtrate lipase extract produced by *Beauveria bassiana* CG432: (a) Incubated at optimal activity conditions at pH 8.5 and 40, 45, 50 and 55°C over 10 hours. (b) Stored at frozen -20°C; room temperature, 25-30°C; and under refrigeration, 4°C over 10 days. All assays were carried out for *p*-NPP emulsion hydrolysis.

NaCl concentrations from 0.1 to 2M had no influence on activity of lipases produced by *B. bassiana* on Alves broth supplemented with OR from canola (Table 2). These results, together others presented above to lipase stability, are very good information to helps the choice of purification methodologies of these lipases.

Table 2 – Effect of NaCl concentrations on activity of lipase produced by *B. bassiana* on Alves broth supplemented with OR from canola

NaCl (M)	Lipase activity	
	U ml ⁻¹	%
0.0	203.49	81.76
0.1	220.29	88.51
0.2	239.28	92.14
0.4	247.90	96.30
1.0	248.88	100.00
2.0	185.83	74.66

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Pedro M. O. J. Neves (Agronomy Department/UEL) for supplying the *B. bassiana* strain, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES/Brazil) for school and masterships, and the Unidade Gestora do Fundo Paraná - Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná (UGF/SETI/Pr/Brazil) for grants.

REFERENCES

- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998..
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.
- BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G. **Lipolytic enzymes**. Academic Press, INC, 1974.
- CASTRO-OCHOA, L. D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 6, p. 648-654, 2005.
- CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Process Biochemistry**, Essex, v. 97, n. 17, p. 2195-2310, 2006.
- CRUZ, M. C. B. et al., 2009 (personal communication)
- LIMA, V. M. G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004.
- FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 89-91, 1970.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 51, n. 6, p. 12-16, 2006.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n. 9, p. 637-642, 1988.
- HOFFMAN, G. **The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products**. San Diego: Academic Press, 1989
- HUI, Y. H. Edible oil and fat products: general applications. In: _____. **BAYLEY'S industrial oil and fat products**. 5. th ed. New York: John Wiley, 1996. Cap. 10, v. 1.
- JONES, A. M.; PORTER, M. A. Vegetable oils in fermentation: beneficial effects of low-level supplementation. **Journal of Industrial microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 21, n. 4/5, p. 203-207, 1998.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulations and processing for applications**. Lancaster: Second Edition, 1998.
- SARIKAYA, Y. Blanqueo de aceites vegetales y tierras de blanqueo. **Aceites y Graxas**, p. 69-72, 1994.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SILVA, W. O. B. et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 30-37, 2008.

WINKLER, U. K. E.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **The Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YANG, J. G. et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 1, p. 101-104, 2006.

5.2 ARTIGO B

**SIMULTANEOUS HIGH LIPASE AND LOW BIOMASS PRODUCTION IN
SUBMERGED FERMENTATION of *Beauveria bassiana*.**

**Michele Cristina Barreto da Cruz; Geni da Silva Varéa; Dalva Tomoe Miyagui; Vanessa
Hitomi Sugahara; Dionísio Borsato**

**SIMULTANEOUS HIGH LIPASE AND LOW BIOMASS PRODUCTION IN
SUBMERGED FERMENTATION of *Beauveria bassiana*.**

**Michele Cristina Barreto da Cruz; Geni da Silva Varéa^{1*}; Dalva Tomoe Miyagui¹;
Vanessa Hitomi Sugahara; Dionísio Borsato²**

Abstract

The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* CG432 produced simultaneous high lipase and low biomass on the fourth day of cultivation in Vogel broth containing 0.35% surfactant Triton X-100, 0.75% olive oil and 1.5% urea at 28°C and 200rpm. Lipase production increased 229% and biomass decreased 441%, based on the results of desirability tests for both responses that were obtained by experiments of incomplete factorial design 2^{4-1} and 2^{3-1} by response surface methodology. Culture broth increased in lipid content and became a strong emulsion in 5 to 8 days suggesting synthesis of lipids. Optimal temperature and pH conditions for lipase activity were found to be 45°C and pH 8.5 using 50 mM Tris-HCl buffer, verified by a hydrolysis *p*-nitrophenol palmitate assay. Under these conditions, lipase was 50% stable for approximately 20h, however it was stable for up to three weeks when either frozen (-18°C), refrigerated (4°C) or kept at room temperature (25°C). Due to these characteristics, it can be used as biotechnological agent for industrial processes.

Keywords: *Beauveria bassiana*. Lipase production. Biomass production. Response surface methodology.

1 INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3) catalyze, at the lipid water interface, the hydrolysis and synthesis of the ester bonds of acylglycerols in aqueous and non-aqueous media, respectively. The renewed interest in this class of enzymes is due to its versatility and thermo/acid/alkali stability, conditions sometimes required for biotechnological applications such as biodiesel production [1], the non-chemical processing of edible oil [2], the synthesis of L-menthyl butyrate, a refreshing flavor [3], the treatment of wastewater [4] or use in detergent formulations [5].

¹ Biochemistry and Biotechnology Department. State University of Londrina (UEL) Caixa PO Box 6001, CEP 86051-990, Londrina-PR, Brazil

² Chemistry Department. * Corresponding author at Biochemistry and Biotechnology Department, State University of Londrina. Rodovia Celso Garcia Cid PR445 Km 380, Jardim Perobal. Caixa Postal 6001, CEP 96051-990, Londrina – PR – Brazil. E-mail address gpvarea@uel.br

Microbial lipases have been produced using various oil and oil residue substrates [6, 7], surfactants and nutrient sources [8], as well as in research about new producer microorganisms. The entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* has been isolated around the world [9]. Extracellular protease and chitinase have been the focus of studies about the biocontrol of insect pests [10], but only one study has been published about lipases produced by *B. bassiana* after 5 days in a broth with 2% olive oil [11]. Lipases are involved in fungal infection because they degrade the waxy layer covering the exoskeleton [12, 13].

The production of extracellular lipase for biotechnological applications is better suited for industrialized settings because protein extraction from the culture medium is facilitated, however this process can be difficult when excess biomass is produced during cultivation. The multifactorial processes involved in cultivation and extraction depend on the control of many environmental conditions. Response surface methodology (RSM) is a tool that can resolve some of these complications. The factorial design of a limited set of variables is advantageous compared to the conventional method, because it requires a reduced number of experiments and considers the effect of possible interactions between factors [14].

The objective of this study was to evaluate nutrient concentrations necessary for simultaneously obtaining high lipase and low biomass production in cultures of *B. bassiana* by RSM. The time course, consumption of nutrients and some activity and stability characteristics of the produced lipase were studied as well.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism

B. bassiana CG432 was isolated from Hemiptera and was subcultured onto agar plates with (%): 1.0 glucose, 0.5 yeast extract, 0.16 NaNO₃, 0.036 KH₂PO₄, 0.1 KCl, 0.11 Na₂HPO₄, 0.06 MgSO₄ [9].

2.2 Culture conditions

All cultivations of *B. bassiana* were inoculated with 10⁶ conidia/ml in 25ml of Vogel broth [15] (Erlenmeyer flaks 250 ml) with 0.1% CaCl₂, and were performed at 28°C and 200rpm (shaker) under varying conditions of time and nutrient concentration. Biomass and lipase extract (LE) were separated by centrifugation (8000xg 20 min, 4°C). LE was

dialyzed against 5mM phosphate buffer at pH 7. Biomass was quantified by gravimetric method.

2.3 Experimental design for optimization of broth nutrients

RSM was used to define the optimum concentrations of broth nutrients (factors X) to obtain simultaneous high lipase and low biomass production (responses Y) for *B. bassiana* over five days of cultivation. The first experiment was based on data from the literature [16, 8]. It consisted of a 2^{4-1} incomplete factorial design with three coded levels (-1; 0; +1) of the factors Triton X-100 (X_1), glucose (X_2), olive oil (X_3) and urea (X_4) (Table 1). The second was based on the results of desirability tests predicted by the initial experiment. It was a 2^{3-1} incomplete factorial design of the same factors, with the exception of glucose (Table 3). SAS software (version 7.0) was used for data processing.

2.4 Lipase production and fungal growth at optimized conditions

The growth curve of *B. bassiana* and time course of lipase production were observed for eight days using optimized conditions predicted by RSM: 0.35% Triton X-100, 0.75% olive oil, 1.5% urea. The daily collected LE was used for the final pH, lipase assay and analytical determinations.

2.5 Lipase assay

The substrate *p*-nitrophenyl palmitate (*p*-NPP, Sigma) was used for most of the lipase activity determination [17], but with a 100mM TRIS-HCl pH 8.5 buffer containing 0,4% Triton X-100 at 50°C for 2 min. Lipase activity was confirmed by the titrimetric method [18] only on stability tests. One Unit of lipase activity was $1\mu\text{M pNP ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and $1\mu\text{mol free fatty acid ml}^{-1} 12\text{h}^{-1}$ liberated, respectively.

2.6 Analytical determinations

Protein, reducing sugar and lipids contents were determined by Bradford [19], Miller [20] and Frings and Dunn [21] methods, respectively. Protease activity was assayed according in Ito et al. [22].

2.7 Optimal temperature and pH determination of lipase

LE obtained on the 4th day of cultivation had been previously ultra filtered (membrane cutoff 100kDa), since lipases can form molecular mass aggregates greater than 80kDa on salt solutions [23]. This was called ultra filtrate lipase fraction (UFLE) and was assayed for the hydrolysis of *p*-NPP from 20 to 60°C using the following pH buffers: sodium acetate (3.5 to 6.0), sodium phosphate (6.0 to 7.5), TRIS-HCl (7.5 to 9.0) and sodium phosphate NaOH (9.0 to 12.0) at 45°C.

2.8 Lipase stability in storage and at optimal activity conditions

UFLE from the 4th day of cultivation was assayed by the *p*-NPP emulsion hydrolysis method after having been stored at room temperature (25±5°C), under refrigeration (5±2°C) and frozen (-18°C) for 60 days. When preincubated at optimal temperature and pH conditions (45°C and TRIS-HCl 50mM buffer pH 8.5), it was assayed by *p*-NPP emulsion hydrolysis and titrimetric methods for 60 hours.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 First experimental design

The first experiment investigated which factors were most important for generating optimum conditions for high lipase (Y_1) and low biomass (Y_2) responses. Table 1 shows the conditions of runs 2 and 8 generated the best lipase production (134U ml⁻¹), but also the least (0.09g 25ml⁻¹) and the greatest (0.31g 25ml⁻¹) biomass production, respectively. Runs 2 and 8 both used maximum levels of Triton X-100 (0.05%) and urea (3.0%), showing the importance of these factors in increasing lipase production, and they also used the minimum and the maximum levels of glucose (0.0 and 0.2%) and olive oil (1.0 and 3.0%) indicating that both factors had no impact on lipase production at these concentrations.

Table 1 – Responses and experimental domain of first experimental incomplete factorial design (2^{4-1}).

Runs	Coded and actual levels (%) of factors (X)								Responses (Y)	
	Triton (X ₁)		Glucose (X ₂)		Olive oil (X ₃)		Urea (X ₄)		Lipase ^a	Biomass ^b
	Coded	Actual	Coded	Actual	Coded	Actual	Coded	Actual	(Y ₁)	(Y ₂)
1	-1	0.01	-1	0.0	-1	1.0	-1	0.1	34	0.34
2	+1	0.05	-1	0.0	-1	1.0	+1	0.3	134	0.09
3	-1	0.01	+1	0.2	-1	1.0	+1	0.3	59	0.14
4	+1	0.05	+1	0.2	-1	1.0	-1	0.1	24	0.13
5	-1	0.01	-1	0.0	+1	3.0	+1	0.3	32	0.26
6	+1	0.05	-1	0.0	+1	3.0	-1	0.1	52	0.29
7	-1	0.01	+1	0.2	+1	3.0	-1	0.1	28	0.31
8	+1	0.05	+1	0.2	+1	3.0	+1	0.3	134	0.31
9	0	0.025	0	0.1	0	2.0	0	0.2	65	0.19
10	0	0.025	0	0.1	0	2.0	0	0.2	83	0.20
11	0	0.025	0	0.1	0	2.0	0	0.2	78	0.22

^aLipase activity (U.ml⁻¹); ^bbiomass concentration (g.25ml⁻¹).

The statistical significance of both responses was checked for the coefficients of determination; R^2 was calculated to be 0.9642 and 0.9669, respectively (Table 2). This indicated that the model described the studied region well, because 96.42% and 96.69% of variability in these responses could be explained by the model used, the rest (around 3.3%) being explained by the residues. Regression analysis for the first experiment showed that Triton X-100, urea and their mutual interaction had strong effects on the response lipase production due their high and positive coefficients: 23.82, 27.68 and 20.49, respectively - these effects being statistically significant at 95.0% ($P < 0.05$) confidence level by ANOVA analysis (Table 2). Since the lack of fit was not statistically significant ($P > 0.05$), the regression model was adjusted to the experimental data, indicating that a median value (62.30 ml⁻¹) of lipase production could increase the up to 140U ml⁻¹ when Triton X-100 was used at 0.05% and urea at 0.3% (Figure 1a).

Interestingly, while the maximum levels of Triton X-100 and urea were important for increasing lipase production, they were also important for decreasing biomass production, since regression analysis showed negative coefficients, -0.03, statistically significant at 95.0% ($P < 0.05$) confidence level. Furthermore, although the factor olive oil had no importance in increasing lipase production, the use of a minimum level (1.0%) reduced biomass production (Figure 1b), since increasing the concentration of this factor reduced production of biomass at a 99% confidence level ($P = 0.0057$) (Table 2).

Table 2 – Statistical analysis for incomplete factorial design 2^{4-1} for first experimental design

Runs	Lipase activity (U.ml ⁻¹) R ² = 0.9642		Biomass (g.25ml ⁻¹) R ² = 0.9669	
	Coefficient	P [*]	Coefficient	P [*]
Mean/intercept	62.30	-	0.23	-
(X ₁) Triton	23.82	0.0188 ^a	-0.03	0.0213 ^a
(X ₂) Glucose	-0.77	0.8380	-0.01	0.0985
(X ₃) Olive	-0.58	0.8773	0.06	0.0057 ^b
(X ₄) Urea	27.68	0.0140 ^a	-0.03	0.0163
X ₁ *X ₂	-6.1	0.2070	0.02	0.0263 ^a
X ₁ *X ₃	7.85	0.1414	0.03	0.0142 ^a
X ₁ *X ₄	20.49	0.0252 ^a	-0.03	0.0213 ^a
Lack of Fit	-	0.1751	-	0.0689

^a $P < 0.01$ statistically significant at 95.0% and ^b99.0% confidence level, respectively

Desirability tests using all results obtained from the first experiment showed that if a second experiment were carried out with 0.05% surfactant Triton X-100, 0.3% urea (maximum levels +1), no glucose (0% minimum level) and reduced olive oil concentrations approaching 1% (minimum level -1), the mean values (intercept) presented in Table 2 for lipase production could be as high as 137.487U ml⁻¹ and biomass concentration as low as 0.08792g.25ml⁻¹, as demonstrated in Figure 2.

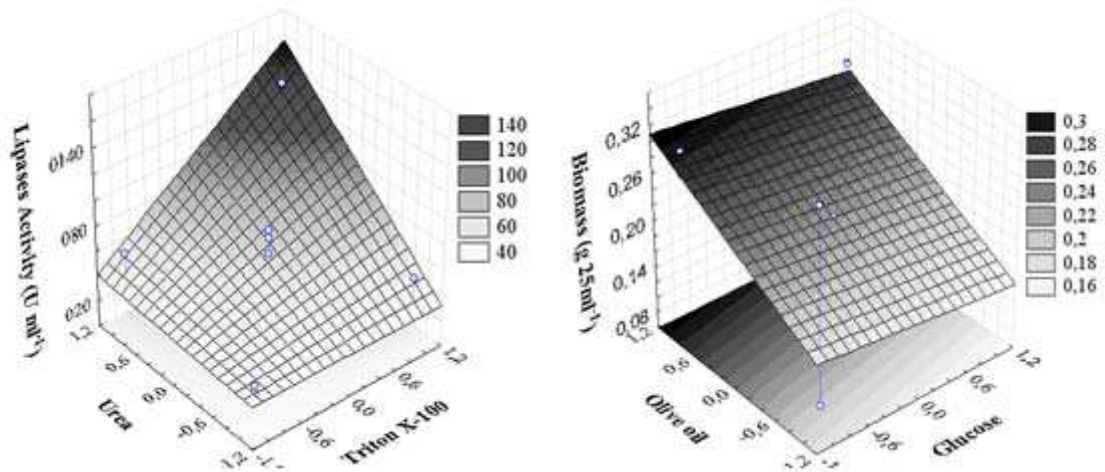


Figure 1 – Response surface plots obtained by first experiment. Effect of Triton X-100 and urea concentrations, and their mutual interaction on lipase production (a) and effect of glucose and olive oil concentrations on biomass production (b). Other parameter concentrations are constant at 0 levels.

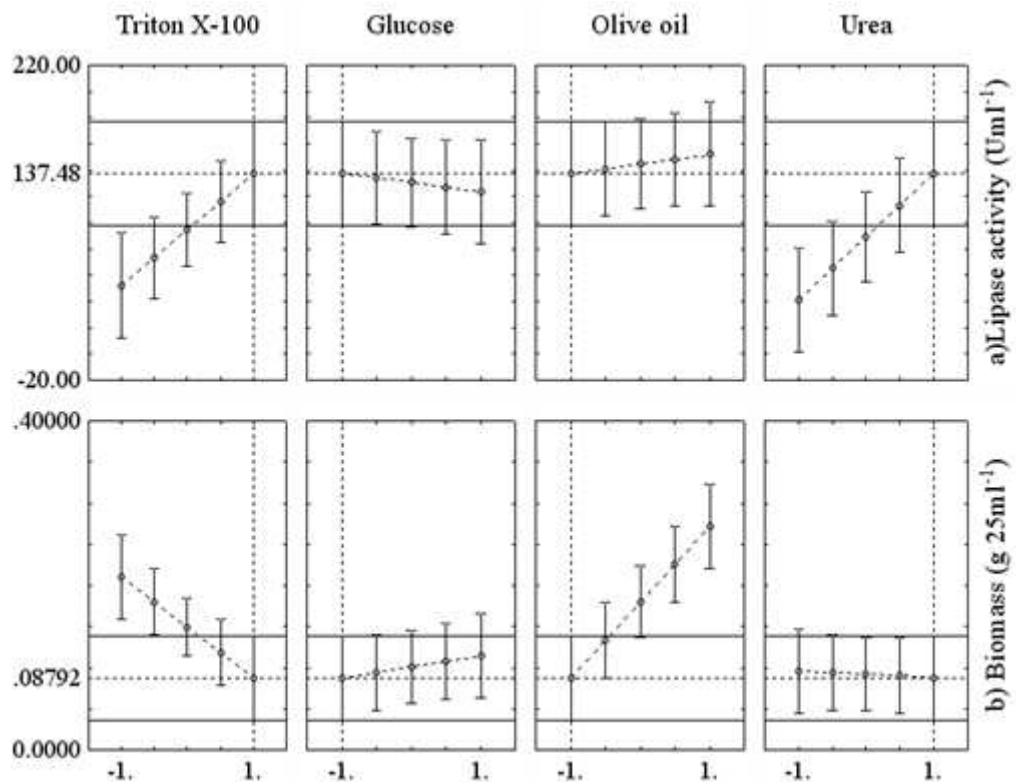


Figure 2 – Profiles for predicted values for simultaneously obtaining high lipase, and low biomass from first experiment with submerged cultures of *Beauveria bassiana* CG432. Interrupted horizontal lines represent media values of responses and the interrupted vertical lines represent the levels of the factors necessary for simultaneously obtaining optimum and desirable conditions.

3.2 Second experimental design

Lipase production increased about 45%, being 192 and 198U ml⁻¹ in runs 3 and 4, respectively (Table 3), by using only the maximum level of olive oil (1%) and the maximum and minimum levels of Triton X-100 (0.05 and 0.5%) and urea (0.3 and 1.5%). The lowest biomass (0.044g 25ml⁻¹) was obtained in run 4. Although the greatest biomass was 0.132g 25ml⁻¹ (run 3), this value was three times lower than the 0.30g 25ml⁻¹ of biomass produced when lipase production was highest in the first experiment (Table 1, run 8). For intermediate levels of all factors (central point, runs 5-7, Table 3) the average biomass was very small (0.033g 25ml⁻¹), but these conditions decreased lipase production approximately 10%.

Table 3 – Responses and experimental domain of second experimental incomplete factorial design (2³⁻¹).

Runs	Coded and actual levels (%) of factors (X)						Responses (Y)	
	Triton X-100 (X ₁)		Olive oil (X ₂)		(Urea) X ₃		Lipase ^a	Biomass ^b
	Coded	Actual	Coded	Actual	Coded	Actual	(Y ₁)	(Y ₂)
1	-1	0.05	-1	0.0	+1	1.5	3.7	0.041
2	+1	0.45	-1	0.0	-1	0.3	5.9	0.111
3	-1	0.05	+1	1.0	-1	0.3	192	0.132
4	+1	0.45	+1	1.0	+1	1.5	198	0.044
5	0	0.25	0	0.5	0	0.9	167	0.016
6	0	0.25	0	0.5	0	0.9	178	0.033
7	0	0.25	0	0.5	0	0.9	177	0.050

^aLipase activity (U ml⁻¹); ^bbiomass concentration (g 25ml⁻¹).

Coefficients of determination, R², for lipase and biomass production were 0.9982 and 0.9049, respectively, indicating a good fit of the model with experimental data from the second experiment (Table 4). Olive oil and mutual interaction among all factors were the most important for lipase response, due to their coefficients of 95 and 74, both being statistically significant at a 99.0% ($P < 0.01$) confidence level.

Table 4 – Statistical analysis for incomplete factorial design 2^{3-1} for second experimental design

	Lipase activity (U.ml ⁻¹) R ² = 0.9982		Biomass (g.25ml ⁻¹) R ² = 0.9049	
	Coefficient	P	Coefficient	P
Mean/intercept	174	-	0.0810	-
(X ₁) Triton	2.1	0.5775	0.0060	0.9080
(X ₂) Olive	95.0	0.0011 ^a	-0.0395	0.8778
(X ₃) Urea	1.0	0.7833	0.0010	0.3704
X ₁ *X ₂ *X ₃	-74.0	0.0043 ^a	0.0810	0.9865

^aP<0.01 statistically significant at 95.0% and ^b99.0% confidence level, respectively

The means for lipase and biomass obtained in the second experiment were 174U ml⁻¹ and 0.081g 25ml⁻¹ (Table 4), but they, as shown by desirability tests (Figure 3), could reach predicted values as high as 205.097U ml⁻¹ and as low as 0.0425g 25ml⁻¹, respectively, when cultures of *B. bassiana* are incubated using 0.35% Triton X-100, 0.75% olive oil (coded levels 0.5) and 1.5% urea (coded level 1.0). These results were accepted as optimal conditions because lipase increased 229% (from 62.30U ml⁻¹ to 205U ml⁻¹) and biomass decreased 441% (from 0.23g 25ml⁻¹ to 0.0425g 25ml⁻¹) from the first experiment (Table 2). Similar influences of carbohydrates on lipase production are found in the literature, because glucose, fructose, glycerol, xylose, sucrose and lactose added to the solid state fermentation of *Rhizopus homothallicus* were of little or no influence on lipase production. This is probably due to their utilization before the oil and, consequently, before the lipase production [8]. *Rhizopus arrhizus* consumed glucose and olive oil for a significant increase in biomass but not in lipase production, since high levels of glucose repressed the biosynthesis of lipase [16]. On the other hand, the use of only 0.75% olive oil to produce high lipase is a contribution since, according Rodriguez et al. [8], lipase production by submerged fermentation has been limited at concentrations above 1.5% oil.

Silva et al. [24] produced high biomass concentration and lipase production on basal medium by adding sunflower oil and olive oil, respectively, to *Metarhizium anisopliae*, and they also found better extraction and activity lipase when the surfactants SDS, Tween 80 and Triton X-100 were added after 50h of fungal growth. [25].

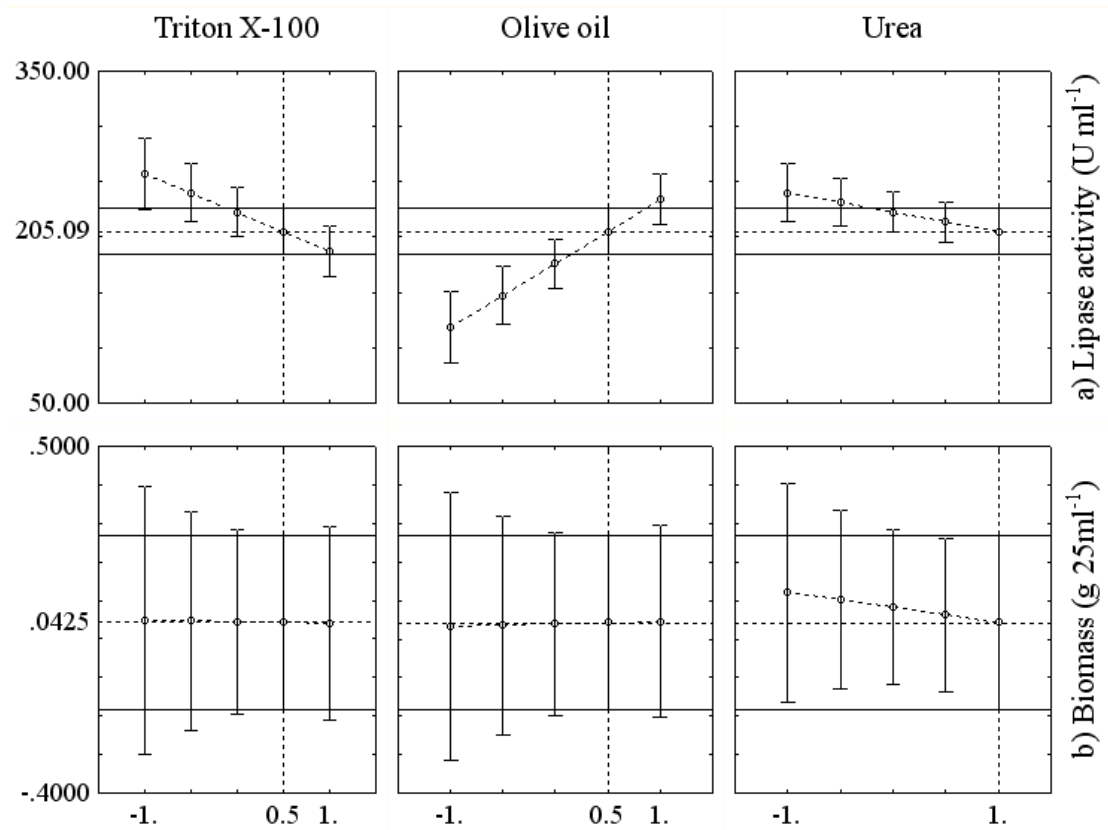


Figure 3 –Profiles of predicted values for simultaneously obtaining high lipase (a) and low biomass (b) in the second experiment with submersed cultures of *Beauveria bassiana* CG432. Interrupted horizontal lines represent media values of responses and the interrupted vertical lines represent the levels of the factors necessary for simultaneously obtaining optimum and desirable conditions

3.3 Lipase production and fungal growth using the improved conditions

Time courses for the growth and lipase production of *B. bassiana* were developed using optimum conditions indicated by RSM. The fungus grew only after 4 to 5 days of cultivation, reaching 0.1568 and 0.2316g.25ml⁻¹ of biomass for the above-mentioned days, and followed a similar time course to that of lipase production, which increased to 296.66 U.mL⁻¹ and 320.65U mL⁻¹ on days 4 and 5, respectively (Figure 4a). This is in accordance with the cultivation of *B. bassiana* GK2116 in broths containing 5% olive oil, where extracellular lipase was detected only after an early stationary phase or after 5 days of cultivation [11]. After 6 days, lipase production decreased around 60% (Figure 5a). Since no protease activity was found on any day (data not shown), this result might be related to the faster catabolism, by its own lipase produced, of free fatty acids released into the culture broth, making such production for the hydrolysis of the olive oil less necessary [26]. Based on these results, and in order to investigate some of the activity and stability characteristics of the

produced lipase, we chose the LE from 4th day because lipase activity was significantly different from the highest level obtained on the 5th day, and had the advantage of producing lower biomass.

The pH of the cultivations was decreased until the third day and after that day, the pH increased to 6.6, (Figure 5b), probably due to the ammonia generated by the lipase production of the fungus in order to use the olive oil [27] added to the Vogel broth. Ambient pH was determinant in the expression of cuticle degradation by *M. anisopliae*, since mRNA encoding and maximum activity of Pr1a, Pr1b, Pr2 and carboxypeptidase were observed when the pH of the culture was close to optimum [28]. Metabolic acid was observed in *B. bassiana* mutants grown on peptone agar with 1 to 10% glucose, 1% maltose or glycerol [29].

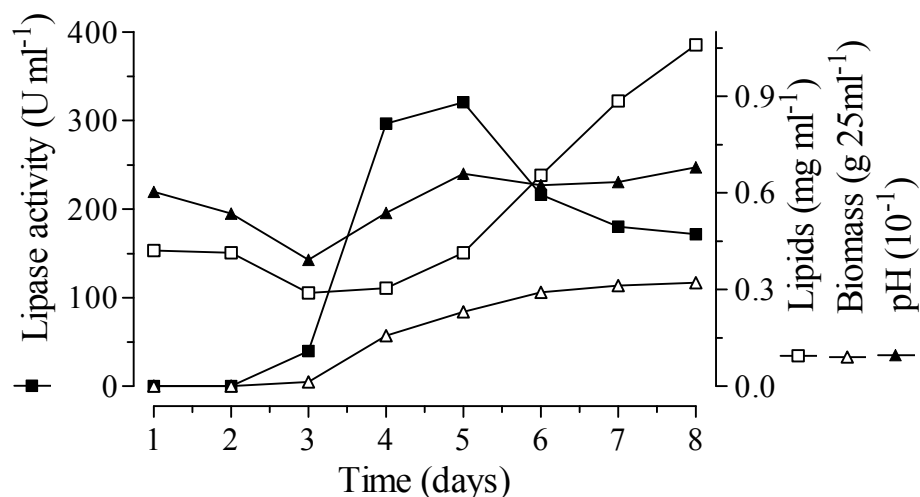


Figure 4 – Growth curve, time course of lipase production (a) and consumption of nutrients (b) by *Beauveria bassiana* CG432 cultured at 200rpm at 28°C during 8 days on Vogel broth containing CaCl₂ 0.1%, Triton X-100 0.35%, olive oil 0.75%, urea 1.5%. Inoculum was 1% (v/v) of a suspension containing 10⁸ conidia ml⁻¹

Despite the low (0.75%) quantity of olive oil used in the culture, the lipid content was slightly reduced during both the lag and log phases and, surprisingly, increased during the later stationary phase of fungus growth (Figure 5b), when the metabolic medium became a visibly strong emulsion and impeded LE collection from the 5th to the 8th day of culture. This micro-aqueous environment probably contributed to esterification reactions by means of the free fatty acids from the lipase produced by *B. bassiana* that had been released into the culture broth. This problem can be avoided if the LE is collected on the fourth day.

3.4 Optimal temperature, pH and lipase stability

The optimal temperature and pH for UFLE were 45°C and 8.5 (Figures 5a and 5b). As observed by Lima et al. [18], no lipase activity assays were performed above 60°C or pH 10, due to spontaneous hydrolysis of *p*-NPP. Lipases produced by entomopathogenic fungi *B. bassiana* [11], and *M. anisopliae* [24] were assayed at pH 8.0/30°C and pH 8.0/37°C, respectively, but optimum conditions were not determined by these authors.

When frozen, UFLE remained 100% stable, but it was totally inactivated after 5 days of storage at room temperature. It presented 50% of its initial activity after 10 days of storage at 4°C and 20h of incubation, and after being assayed at optimal temperature and pH (45°C and 8.5) by *p*-NPP hydrolysis and again after 10h by the titrimetric method (Figure 5c). Most microbial lipases reported so far were in these ranges, as was the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* [23].

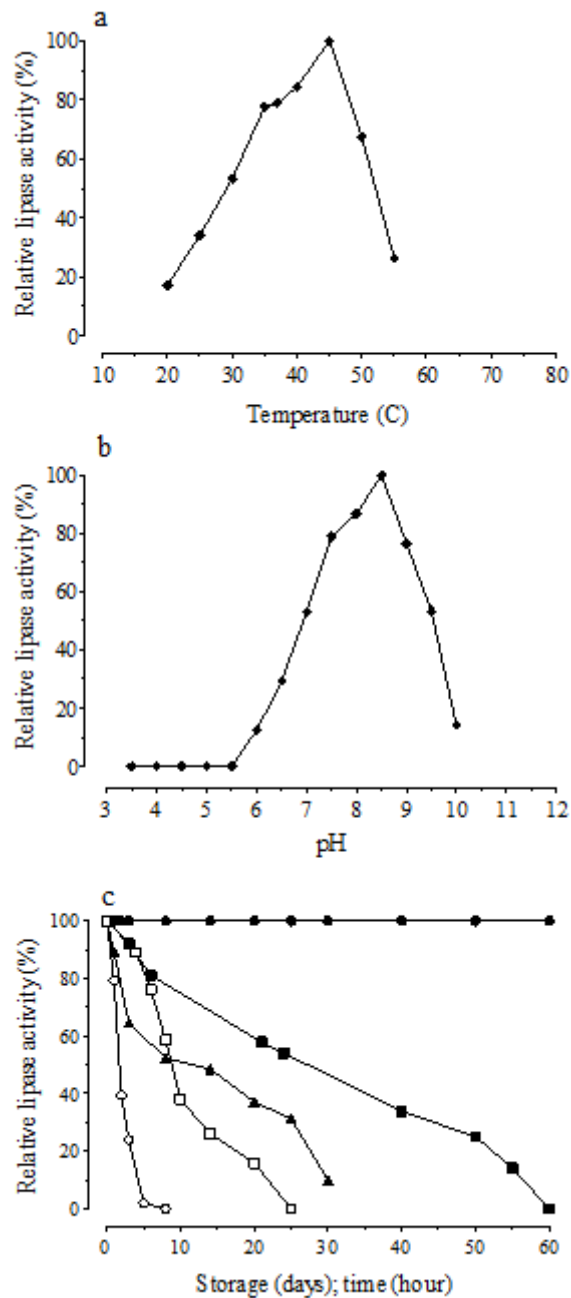


Figure 5 – Characteristics of ultra filtrate lipase extract produced by *Beauveria bassiana* CG432. (a) Incubation at 10 to 55°C, (b) pH sodium acetate at pH 3.5 to 6.0, sodium phosphate at pH 6.0 to 7.5, TRIS-HCl at pH 7.5 to 9.0, and sodium phosphate NaOH at pH 9.0 to 10.0.(c) Stability of lipases incubated in frozen at -20°C (●), room temperature at 25°C (○) and refrigerated at 4°C (▲) over 60 days; at optimal activity conditions at 45°C and pH 8.5 assayed for *p*-NPP emulsion hydrolysis (□) and titrimetric method (■) by during 60 hours

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors would like to thank Dr Pedro M. O. J. Neves (Agronomy Department/UEL) for supplying the *B. bassiana* strain, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil) and Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES/Brazil) for school and masterships, and the Unidade Gestora do Fundo Paraná - Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia e Ensino Superior do Estado do Paraná (UGF/SETI/Pr/Brazil) for grants.

REFERENCES

- [1]HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 51, n. 6, p. 12-16, 2006.
- [2]YANG, J. G. et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 1, p. 101–104, 2006.
- [3]SHIH, I. L. et al. Optimized synthesis of lipase-catalysed l-menthyl butyrate by *Candia rugosa* lipase. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 3, p. 1223-1228, 2007.
- [4]CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Process Biochemistry**, Essex, v. 97, n. 17, p. 2195-2310, 2006.
- [5]SAISUBRAMANIAN, N. et al. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal Indian Microbiol Biotechnology**, New Delhi, v. 33, n. 8, p. 669-676, 2006.
- [6]GULATI, R. I. J. et al. Production of a novel lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 251-262, 2005.
- [7]GUTARRA, M. L. E. et al. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using residue from babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 313-318, 2007.
- [8]RODRIGUEZ, J. A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Essex, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.
- [9]ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- [10]PEREIRA, J. L. et al. Novel Insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 573-581, 2007.
- [11]HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n. 9, p. 637-642, 1988.
- [12]STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 347-355, 2003.
- [13]PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUARÉZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C**, New York, v. 146, n. 1/2, p. 124-137, 2007.
- [14]KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Essex, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.
- [15]VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, Columbus, v. 13, n. 1, p. 42-43, 1956.

- [16] ELIBOL, M. E.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 38, n. 3, p. 367-372, 2002.
- [17] WINKLER, U. K. E.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **The Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.
- [18] LIMA, V. M. G. et al. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004b.
- [19] BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.
- [20] MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- [21] FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 89-91, 1970.
- [22] ITO, E. et al. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hyphothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 217-223, 2007.
- [23] CASTRO-OCHOA, L. D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 6, p. 648-654, 2005.
- [24] SILVA, W. O. B. et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.
- [25] SILVA, W. O. B. et al. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 44, n. 8, p. 829-834, 2009.
- [26] FREIRE, D. M. G. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: media composition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 63, n. 1, p. 409-421, 1997.
- [27] ST LEGER, R. J.; NELSON, J. O.; SCREEN, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology**, Washington, v. 145, p. 2691-2699, 1999.
- [28] ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 709-713, 1998.
- [29] BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to an utilizable carbon source but not to virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 62, p. 53-57, 1993.

CONCLUSÕES GERAIS

- Lipases produzidas em OR apresentaram temperaturas e pH ótimos entre 40 a 60°C e 7,5 e 8,5, respectivamente, enquanto que as lipases produzidas em óleo de oliva as condições ótimas foram a 45°C e pH 8,5.
- Lipases produzidas em óleo de oliva foram mais estáveis que as lipases produzidas em OR sob armazenamento à temperatura ambiente, de refrigeração e de congelamento, e quando incubadas sob suas respectivas condições ótimas de atividade.
- Condições indicadas pela MSR demonstraram que cultivos de 4 dias em meio de Vogel contendo 0,35% do surfactante Triton X-100, 0,75% óleo de oliva e 1,5% uréia aumentaram produção de lípases em 229% ao mesmo tempo em que reduziram produção de biomassa em 441%.

REFERÊNCIAS

- AIRES BARROS, M. R. et al. Isolation and purification of lipases. In: WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B. (Ed.). **Lipases: their structure**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 243-270.
- AKIMOTO, M. et al. Lipase-catalyzed interesterification of soybean oil with an Omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate prepared from sardine oil. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Clifton, v. 104, n. 2, p. 105-118, 2003.
- AKOH, C. C.; LEE, G. C.; SHAW, J. F. Protein engineering and applications of *Candida rugosa* lipase isoforms. **Lipids**, Champaign, v. 39, n. 6, p. 513-526, 2004.
- ALIPHAT, S. et al. **Process for enzyme pretreatment of drill cutting**. Patente Nr. Us 5725771, 15 Apr. 1996, 3 October 1998.
- ALMEIDA, R. V. **Clonagem e expressão do gene de uma lipase de *Pyrococcus furiosus* em *Escherichia coli***. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- ALMEIDA, R. V. et al. Cloning, expression, partial characterization and structural modeling of a novel esterase from *Pyrococcus furiosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 9, p. 1128-1136, 2006.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682)**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Rio de Janeiro.
- ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study. **Biotechnology Progress**, New York, v. 21, n. 5, p. 1442-1448, 2005.
- ARBIGE, M. V.; PITCHER, W. H. Industrial enzymology: a look towards the future. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, n. 12, p. 330-335, 1989.
- ARCOS, J. A.; OTERO, C. Enzyme, medium and reaction engineering to design a lowcost, selective production method for mono- and dioleoyl glycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 73, n. 6, p. 673-682, 1996.
- ARNOLD, F. H.; MORRE, J. C. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. **Advanced Biotechnology**, Chennai, v. 58, n. 1, p. 2-14, 1997.
- BEVILAQUA, J. V. et al. Enzymatic hydrolysis by immobilized lipase applied to a new prototype anti-asthma drug. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 103-110, 2004.
- BIDOCHKA, M. J.; KHACHATOURIANS, G. G. Oxalic acid hyperproduction in *Beauveria bassiana* mutants is related to an utilizable carbon source but not to virulence. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 62, p. 53-57, 1993.
- BIER, M. L. **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1955. v. 1.

BORNSCHEUER, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 6, p. 543-547, 2002.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments: An introduction to design data analysis and model building**. Wiley. New York, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, London, v. 343, n. 22, p. 767-770, 1990.

BROCCA, S. et al. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip I gene coding for a major industrial lipase. **Protein Science**, Cold Spring Harbor, v. 7, n. 6, p. 1415-1422, 1998.

BROCKERHOFF, H.; JENSEN, R. G. **Lipolytic enzymes**. Academic Press, INC, 1974.

BROCKMAN, H. L. General features of lipolysis reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In: BORGSTROM, B.; BROCKMAN, H. L. (Ed.). **Lipases**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1984. p. 1-46.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. A review on hydrolytic in the treatment of wastewater with high oil and grease content. **Process Biochemistry**, Essex, v. 97, n. 17, p. 2195-2310, 2006.

CAMMAROTA, M. C.; TEIXEIRA, G. A.; FREIRE, D. M. G. Enzymatic pré-hydrolysis and anaerobic degradation of wastewater with high fat contents. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 23, n. 19, p. 1591-1595, 2001.

CARDENAS, F. et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 14, n. 4/6, p. 111-123, 2001.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997. 460 p.

CARVALHO, P. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 76-80, 2003.

CARVALHO, P. O. et al. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases Microbianas. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CASTILHO, L. R. et al. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 239-247, 2000.

CASTRO-OCHOA, L. D. et al. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 37, n. 6, p. 648-654, 2005.

CERNIA, E.; PALOCCI, C. Lipases in supercritical fluids. **Methods in Enzymology**, New York, v. 296, p. 495-508, 1997.

CLARKSON, J. M.; CHARNLEY, A. K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 197-203, 1996.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 6, p. 863-864, 1999.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. **Journal of Food Engineering**, Malden, v. 22, n. 3, p. 211-219, 2006.

CRUZ, M. C. B. et al., 2009 (personal communication)

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as Basis for Understanding Interfacial Properties of Lipases. **Methods in Enzymology**, New York, v. 284, p. 3-27, 1997.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 657-663, 2000.

DEIVE, F. J.; COSTAS, M.; LONGO, M. A. Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology letters**, Dordrecht, v. 25, n. 17, p. 1403-1406, 2003.

DHARMSTHITI, S.; KUHASUNTISUK, B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: Biochemical properties and application for wastewater treatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 21, n. 1/2, p. 75-80, 1998.

EGGERT, T. et al. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties and three-dimensional structure. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 502, n. 3, p. 89-92, 2001.

EGLOFF, M. P. et al. Les lipases: cinétiques, spécificités et aspects structuraux. In: MALCATA, F. X. (Ed.). **Engineering of/with lipases**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

ELIBOL, M. E.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 38, n. 3, p. 367-372, 2002.

FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**. 4.th ed. New York: Springer Verlag, 2000.

FABER, K. **Special techniques, in biotransformations in organic chemistry**. Berlin: Springer, 1997. p. 345-356.

FICKERS, P. et al. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 742-749, 2004.

FLEET, C.; BREUIL, C. High concentrations of fatty acids affect the lipases treatment of softwood thermomechanical pulps. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 49, n. 5, p. 517-522, 1998.

FREIRE, D. M. G. **Seleção de microrganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por *Penicillium restrictum***. 1996. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Bioquímica, Rio de Janeiro.

FREIRE, D. M. G. et al. Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench scale fermenter: media composition, agitation and aeration. **Applied Biochemistry Biotechnology**, Clifton, v. 63, n. 1, p. 409-421, 1997.

FREIRE, D. M. G. et al. **Production process and composition of an enzymatic preparation, and its use for the treatment of domestic and industrial effluents of high fat, protein and/or carbohydrate content**. Patent Application Nr. EP 01973858.2-2405-BR0100124, 25 april 2002.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em Biocatalise. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R. R. (Org.). **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ, 2008.

FRINGS, C. S.; DUNN, R. T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 89-91, 1970.

GARCIA, H. S. et al. Enrichment of butter oil with conjugated linoleic acid via enzymatic interestification (acidolysis) reactions. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 20, n. 4, p. 393-395, 1998

GHANEM, A.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Lipase-mediated chiral resolution of racemates in organic solvents. **Tetrahedron: Asymmetry**, Oxford, v. 15, n. 21, p. 3331-3351, 2004.

GINALSKA, G.; BANCERZ, R.; KOWALSKA, T. K. A thermostable lipase produced by a newly isolated *Geotrichum*-like strain, R. 59. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 177-182, 2004.

GOTOR-FERNÂNDES, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 40, n. 3/4, p. 111-120, 2006.

GULATI, R. I. J. et al. Production of a novel lipase by *Fusarium globulosum* using neem oil, and its applications. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 251-262, 2005.

GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 64, n. 6, p. 763-781, 2004.

GUTARRA, M. L. E. et al. Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using residue from babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 82, n. 3, p. 313-318, 2007.

- HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. I. Lipases from yeasts (Review). **Acta Biotechnologica**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 159-167, 1991.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 51, n. 6, p. 12-16, 2006.
- HATJE, G. World importance of oils crops and their products. In: ROBBELLEN, G.; DOWNEY, R. K.; ASHRI, A. (Ed.). **Oils crops of the world: their breeding and utilization**. Berkshire: Mc Graw Hill, 1989. p. 6-8.
- HEGEDUS, D. D.; KHACHATOURIANS, G. G. Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n. 9, p. 637-642, 1988.
- HEPBURN, H. R. Structure of the Integument. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. L. **Comprehensive insect physiology**. Oxford: Pergamon, 1985. 1985. v. 3, p. 1-58.
- HIOL, A. et al. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 5/6, p. 421-430, 2000.
- HOFFMAN, G. **The chemistry and technology of edible oils and fats and their high fat products**. San Diego: Academic Press, 1989.
- HUI, Y. H. Edible oil and fat products: general applications. In: _____. **BAYLEY'S industrial oil and fat products**. 5. th ed. New York: John Wiley, 1996. Cap. 10, v. 1.
- ILLANES, A. **Biotecnología de Enzimas**. Valparaiso: Ediciones Universitarias de Valparaiso de La Universidad Católica de Valparaiso, 1994.
- ISO, M. et al. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 53-58, 2001.
- ITO, E. et al. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hyphothenemus hampei*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 2, p. 217-223, 2007.
- JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 315-351, 1999.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.
- JAEGER, K. E. et al. Bacterial lipases. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 29-63, 1994.

- JARROLD, S. L. et al. The contribution of surface waxes to pre-penetration growth of an entomopathogenic fungus on host cuticle. **Mycological Research**, Cambridge, v. 111, n. 2, p. 240-249, 2007.
- JONES, A. M.; PORTER, M. A. Vegetable oils in fermentation: beneficial effects of low-level supplementation. **Journal of Industrial microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 21, n. 4/5, p. 203-207, 1998.
- JUNG, F. B.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Tratamento de efluentes com elevado teor de gordura: enzimas/lodos ativados. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 14., 2002, Natal. **Anais...** Natal, 2002. (CD-Rom).
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, Essex, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.
- KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformations with lipases. In: KELLY, D. R. (Ed.). **Biotechnonology**. 12. th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. v. 8, p. 37-191.
- KOSUGI, Y.; SUZUKI, H.; FUNADA, T. Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas* sp. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 31, n. 4, p. 349-356, 1988.
- LAPENAITE, I.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Current trends in enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, Essex, v. 41, n. 5, p. 1173-1178, 2006.
- LEAL, M. C. M. R. et al. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 175-180, 2002.
- LEZA, A. et al. *Xanthomonas campestris* as a host for the production of recombinant *Pseudomonas aeruginosa* lipase. **Journal of Industrial Microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 22-28, 1996.
- LIAO, H.; MCKENZIE, T.; HAGEMAN, R. Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 83, n. 3, p. 576-580, 1986.
- LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. **Industrial biotransformations**. 2. th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- LIMA, V. M. G. **Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocálise em Solventes Orgânicos**. 2004a. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Curitiba.
- LIMA, V. M. G. et al. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 65-71, 2004b.
- LOTTI, M. et al. Physiological control on the expression and secretion of *Cândida rugosa* lipase. **Chemistry and physics of lipids**, Amsterdam, v. 93, n. 1/2, p. 143-148, 1998.

- LOUWRIER, A.; DRTINA, G. J.; KLIBANOV, A. M. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 50, n. 1, p. 1-5, 1996.
- MARGOLIN, A. L. Enzymes in the synthesis of chiral drugs. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 15, n. 4, p. 266-280, 1993.
- MARTINELLE; M.; HULT, K. Kinetics of triglicéride lipases. In: WOOLEY, P.; PETERSEN, S. B. (Ed.). **Lipases, Their structure, biochemistry and applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. p. 159-180.
- MILED, N. et al. Importance of the lid and cap domains for the catalytic activity of gastric lipases **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 136, n. 1, p. 131-138, 2003.
- MILLER, C. et al. Characteristics of an immobilized lipase for the commercial synthesis of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 68, n. 6, p. 927-931, 1988.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MONTEIRO, J. B.; NASCIMENTO, M. G.; NINOW, J. L. Lipase-catalysed synthesis of monoacylglycerol in a homogeneous system. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 25, n. 8, p. 641-644, 2003.
- MONTESINOS, J. L. et al. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 59, n. 1, p. 25-37, 1996.
- NAKAMURA, K.; KINOSHITA, M.; OHNO, A. Effect of solvent on lipase-catalysed transesterification in organic media. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 50, p. 4681-4690, 1994.
- NOËL, M. et al. Kinetic resolution of rac-2-pentanol catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in the ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]lamide. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 4, p. 301-306, 2004.
- OBRADORS, N. et al. Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 15, n. 4, p. 357-360, 1993.
- O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulations and Processing for Applications**. Lancaster: Second Edition, 1998.
- OLIVEIRA, D. et al. Optimization of enzymatic production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. **Applied and Biochnology**, Clifton, v. 115, n. 1/3, p. 771-780, 2004.
- OLIVEIRA, D. T. M. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia da UFMG, Belo Horizonte.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, n. 2, p. 153-162, 2000.

- PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedade e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.
- PARK, Y. K.; PASTORE, G. M. Esterificação de ácido graxo com glicerol por lipases microbianas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 163-171, 1989.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 135-140, 2003.
- PATEL, R. N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 6, p. 804-826, 2001.
- PEDRINI, N.; CRESPO, R.; JUARÉZ, M. P. Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C**, New York, v. 146, n. 1/2, p. 124-137, 2007.
- PEREIRA, J. L. et al. Novel Insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. **Letters Applied Microbiology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 573-581, 2007.
- PERSSON, M. et al. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 6, p. 833-841, 2002.
- PIAO, J. et al. Synthesis of mono- and dioleoyl erythritols through immobilized lipase catalysed condensation of erythritol and oleic acid in acetone. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 79-84, 2003.
- POUDEROYEN, G. et al. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 309, n. 1, p. 215-226, 2001.
- RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. **Process Biochemistry**, Essex, v. 37, p. 187-192, 2001.
- REED, G. **Enzymes in food processing**. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975.
- REETZ, M. T. Directed evolution of enantioselective enzymes as catalysts of organic synthesis. **Advances Synthesis Catalysis**, Weinheim, v. 49, n. 1, p. 1-69, 2006.
- RIBEIRO, A. P. B. et al. Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 1-22, 2005.
- RODRIGUEZ, J. A. et al. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Essex, v. 41, n. 11, p. 2264-2269, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: AMIC, 2005.

- ROBERTS, S. M. et al. **Introduction to biocatalysis using enzymes and microorganisms**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.
- ROSA, D. R.; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a new solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease. **Environmental Engineering Science**, Larchmont, v. 23, n. 5, p. 814-823, 2006.
- SAISUBRAMANIAN, N. et al. Efficacy of lipase from *Aspergillus niger* as an additive in detergent formulations: a statistical approach. **Journal Indian Microbiol Biotechnology**, New Delhi, v. 33, n. 8, p. 669-676, 2006.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, n. 3, p. 390-393, 2007.
- SANGWATANNAROJ, U.; CHOONUKULPONG, K.; UEDA, M. Cotton souring with pectinase and lipase/protease/cellulase. **AATCC Review and Media**, Nairobi, v. 3, n. 5, p. 17-20, 2003.
- SARDA, L. E.; DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 513-521, 1958.
- SARIKAYA, Y. Blanqueo de Aceites Vegetables y Tierras de Blanqueo. **Aceites y Graxas**, p. 69-72, 1994.
- SAXENA, R. K. et al. Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 101-115, 1999.
- SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 37, n. 12, p. 1608-1633, 1998.
- SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Lipases and a/b hidrolases fold. **Methods in Enzymology**, New York, v. 284, n. 1, p. 87-107, 1997.
- SCHRAG, J. D. et al. Ser-His-Glu triad form the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. **Nature**, London, v. 351, n. 27, p. 761-764, 1991.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.
- SHIH, I. L. et al. Optimized synthesis of lipase-catalysed l-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, n. 3, p. 1223-1228, 2007.
- SILVA, W. O. B. et al. Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 44, n. 8, p. 829-834, 2009.
- SILVA, W. O. B. et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, Essex, v. 40, n. 1, p. 321-326, 2005.

SLOTEMA, W. F. et al. Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalysed amidation with ammonia. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 82, n. 6, p. 664-669, 2003.

STEHR, F. et al. Microbial lipases as virulence factors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 22, n. 5, p. 347-355, 2003.

ST LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 48, n. 1, p. 85-95, 1986.

ST LEGER, R. J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hidrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p.709-713, 1998.

ST LEGER, R. J.; NELSON, J. O.; SCREEN, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracelullar protease production and activity. **Microbiology**, Washington, v.145, p. 2691-2699, 1999.

TAN, T. et al. Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, Essex, v. 39, n. 4, p. 459-465, 2003.

TANADA, Y. Fungal infections. In: _____. **Insect pathology**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 318-387.

TOPALLAR, H. The Adsorption Isotherms of the Bleaching of Sunflower-seed Oil. **Turkish Journal of Chemistry**, Ankara, v. 22, n. 2, p. 143-148, 1998.

VAN VELDHOVEN, P. P. et al. Lipase-based quantitation of triacylglycerols in cellular lipid extracts: requirement for presence of detergent and prior separation by thin-layer chromatography. **Lipids**, Champaign, v. 32, n. 12, p. 1297-300, 1997.

VARGAS, G. D. L. P. **Estudo da produção de lipase por *Penicillium simplicissimum* utilizando torta de soja como substrato**. 2004. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada, Departamento de Ciências Agrárias, Erechim.

VARGAS, V. A. et al. Lipase producing microorganisms from a *Kenyan alkaline* soda lake. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 2, p. 81-86, 2004.

VASIC-RACKI, D. History of industrial bioransformations - Dreams and realities. In: LIESE, A.; SEELBACH, K.; WANDREY, C. (Ed.). **Industrial biotransformations**. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 3-29.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

VERGER, R.; MIERAS, M. C. E.; HAAS, G. H. Action of phospholipase A at interfaces. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 248, n. 11, p. 4023-4034, 1973.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, Columbus, v. 13, n. 1, p. 42-43, 1956.

VULFSON, E. N. Enzymatic synthesis of food ingredients in low water media. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 209-215, 1993.

WANG, D.; XU, Y.; SHAN, T. Effects of oils and oil-related substrates on the synthetic activity of membrane-bound lipase from *Rhizopus chinensis* and optimization of the lipase fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 30-37, 2008.

WANG, Y. J. et al. Lipase catalysed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 31, n. 6, p. 628-633, 1988.

WATANABE, N. et al. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 41, p. 1353-1358, 1977.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 6, p. 1565-1568, 2006.

WINKLER, F. K.; D'ARCY, A. E.; HUNZIKER, W. Structure of human pancreatic lipase. **Nature**, London, v. 343, n. 22, p. 771-774, 1990.

WINKLER, U. K. E.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **The Journal of Bacteriology**, Washington, v. 138, n. 3, p. 663-670, 1979.

YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, N. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 52, n. 12, p. 3015-3021, 1988.

YANG, J. G. et al. Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 1, p. 101-104, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Cover Letter: Simultaneous High Lipase And Low Biomass Production In Submerged Cultivation Of *Beauveria Bassiana*

Department of Biochemistry and Biotechnology
Universidade Estadual de Londrina
Londrina, PR
Brazil

August, 2009

Dear Editor

We are sending the manuscript entitled “**Simultaneous high lipase and low biomass production in submerged cultivation of *Beauveria bassiana***” to be considered for publication in **Process Biochemistry**.

The paper has neither been published nor submitted for publication elsewhere. All authors are in agreement about the transfer of copyright to the publisher.

The article is original in that it studies the effects of nutrient concentrations regarding the simultaneous maximization of lipase production and minimization of biomass in fungal cultivation. The results of this study can be used to facilitate the recuperation of extracellular lipase from the metabolic medium for future use in industrial applications. The use of response surface methodology as well as the presentation of various activity and stability characteristics of the produced lipases adds value to results. Moreover, we found only one study about lipase production by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the literature (published in 1988).

Sincerely,

Dra Geni da Silva Varéa

gpvarea@uel.br

ANEXO B

Instruções Normativas do Process Biochemistry

Process Biochemistry ISSN: 1359-5113 **Impact Factor: 2.336** **Issues per year: 12**

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays.

Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Format and type of manuscripts

Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. For experimental design results, as they are scientifically non exploitable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrammes. Works and data using response surface methodology (RSM) which are mainly descriptive, without any physiological or systemic explanation or correlations are generally rejected without review. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally exceed 25 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables.

Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables.

Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given. The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p. 494.

- [3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.
- [4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.
- [5] Curtin CD. Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.
- [6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. Jpn. Patent. JP 05260-966. 92.03.24.
- [7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.
- [8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. *Physiological stress responses in bioprocesses*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing :

For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information.

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising.

For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting (" Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. **Process Biochemistry has no page charges**

ANEXO C

Manuscript number for paper submission**Bioquímica**

De: "Process Biochemistry" <prbi@elsevier.com>

Para: <gpvarea@uel.br>

Enviada em: terça-feira, 25 de agosto de 2009 04:47

Assunto: A manuscript number has been assigned: PRBI-D-09-00802

MS. Ref. No.:PRBI-D-09-00802

Title: Simultaneous high lipase and low biomass production in submerged cultivation of *Beauveria bassiana*
Process Biochemistry

Dear Geni,

Your submission entitled "Simultaneous high lipase and low biomass production in submerged cultivation of *Beauveria bassiana*" has been assigned the following manuscript number: PRBI-D-09-00802.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ee.elsevier.com/prbi/>.

Your username is: Geni Varéa.

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Gerard Duggan
Journal Manager
Process Biochemistry

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Nenhum vírus encontrado nessa mensagem recebida.
Verificado por AVG – WWW.avgbrasil.com.br
Versão: 8.5.409 / Banco de dados de vírus: 270.13.66/2325 – Data de Lançamento: 08/25/09

ANEXO D

Meio Mínimo de Vogel (1956), Concentrado 50x.

Na ₃ CITRATO 5(1/2). H ₂ O	(citrato de sódio 5(1/2) H ₂ O)	150 g
KH ₂ PO ₄ anidro		250 g
NH ₄ NO ₃ anidro		100 g
MgSO ₄ 7. H ₂ O		10 g
CaCl ₂ 2. H ₂ O		5 g
SOLUÇÃO DE ELEMENTOS-TRAÇOS		5 mL
SOLUÇÃO DE BIOTINA 0,1 mg/mL		2,5 mL
H ₂ O destilada qsp		1000 mL

(O volume final deve ser acertado para 1 litro. Para uso, este meio deve ser diluído 50 vezes em água destilada. O pH dever ser corrigido para 5,8 com ácido fosfórico ou sulfato de amônia).

Preparo:

- 1- Pesar o citrato e o fosfato separadamente e dissolver-los em qs. de água, sem exceder 75% do volume final da solução. Pode-se utilizar leve aquecimento p dissolver o fosfato.
- 2- Verter a solução de citrato na de fosfato e aguardar dissolução completa do último.
- 3- Pesar e adicionar o **nitrato*** aos poucos, até dissolução completa.
- 4- Pesar e adicionar o sulfato e em seguida o cloreto.
- 5- Adicionar solução de elementos-traços e logo após solução de biotina.
- 6- Completar o volume, filtrar se necessário. Verificar pH entre 5,8 - 6,0 quando diluído **1/50 (concentração de uso)**.
- 7- Antigamente o meio de Vogel era acondicionado em frasco com clorofórmio no fundo e tolueno no topo.
- 8- Agora é somente o meio de Vogel mesmo em frasco âmbar. Evitar aspirar com pipeta o meio para a possibilidade de contaminação ser bem rara. Colocar num frasco de Becker a quantidade mais ou menos desejada.

***Adicionar o nitrato somente após o resfriamento completo e não aquecer mais o meio após esta etapa.**

Solução de elementos-traços (roteiro utilizado no laboratório)

Ácido cítrico 1. H ₂ O	5 g
ZnSO ₄ 7. H ₂ O	5 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6. H ₂ O	1 g
CuSO ₄ . 5. H ₂ O	0,25 g
MnSO ₄ 1. H ₂ O	0,05 g
H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
NaMoO ₄ 2. H ₂ O	0,05 g
H ₂ O destilada qsp	100 mL

Solução de biotina: 5 mg de biotina em 50 mL de água destilada.

Solução de elementos-traços e solução de biotina ficam congeladas. O meio de Vogel concentrado 50x fica refrigerado.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbial Genetics Bulletin**, v.13, p.42-3, 1956.