



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

THIAGO ANDRADE MARQUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR UM NOVO ISOLADO DE  
*Trichoderma koningii* E EMPREGO DO EFLUENTE DE  
LACTICÍNIO COMO MEIO DE FERMENTAÇÃO**

---

Londrina  
2013

THIAGO ANDRADE MARQUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR UM NOVO ISOLADO DE  
*Trichoderma koningii* E EMPREGO DO EFLUENTE DE  
LACTICÍNIO COMO MEIO DE FERMENTAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M357p Marques, Thiago Andrade.  
Produção de lipase por um novo isolado de *Trichoderma koningii* e  
emprego do efluente de laticínio como meio de fermentação / Thiago  
Andrade Marques. – Londrina, 2013.  
110 f. : il.

Orientador: Maria Antonia Pedrini Colabone Celligoi.  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, 2013.  
Inclui bibliografia.

1. Enzimas – Aplicações industriais – Teses. 2. Lipase – Fermentação –  
Teses. 3. Enzimas – Produção – Teses. 4. Análise enzimática – Teses. 5. Óleos  
vegetais – Teses. I. Celligoi, Maria Antonia Pedrini Colabone. II. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

THIAGO ANDRADE MARQUES

**PRODUÇÃO DE LIPASE POR UM NOVO ISOLADO DE  
*Trichoderma koningii* E EMPREGO DO EFLUENTE DE  
LACTICÍNIO COMO MEIO DE FERMENTAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em nível de mestrado, do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone  
Celligoi  
UEL – Londrina - PR

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Valéria Marta Gomes de Lima  
UNESP – Assis - SP

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Dionísio Borsato  
UEL – Londrina - PR

Londrina, 06 de maio de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi, que me deu uma oportunidade de estágio em 2007 e com quem aprendi muito durante todos os anos de trabalho no laboratório. Agradeço pela orientação, pela ajuda, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Agradeço a Deus, por ter me dado a oportunidade e me abençoado para poder fazer um mestrado.

À minha mãe, Maria de Fátima de Andrade, para quem devo tudo nessa vida. Obrigado por toda a luta e amor que me ajudaram a realizar meus sonhos. A toda minha família e principalmente ao meu irmão Rodrigo Andrade e minha tia Maria do Carmo pela ajuda em todos esses anos.

À minha noiva e companheira Luana Oshiyama Barros pelo amor, pela ajuda durante esses dois anos. Sempre dando apoio e me incentivando.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez por toda ajuda, amizade e dedicação. Sempre disposto a ajudar e colaborar com o trabalho. Muito Obrigado.

Ao professor Dionísio Borsato, por sua ajuda nas análises estatísticas e participação durante todo o trabalho.

À professora Elba Pinto da Silva Bon, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) por ter cedido o microrganismo, que foi utilizado nesse trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia.

Aos amigos: Patrícia Bittencourt, Tamires Minucelli, Leonardo Cardoso, Lucas Bissoqui, Danielle Ferreira, Karita Reis, Jaqueline Bordini, Flávia Debiagi, Nicole, Dieyssi, Vinicius, Jarbas Rogatte e Henrique Netzel. Muito obrigado a todos pela ajuda, pela amizade e por contribuírem em todos os dias desse trabalho.

Especialmente, aos amigos e companheiros para todas as horas: Emilyn Emy Matsumura e Ismael Amador. Agradeço a amizade e todos os momentos de alegria que passamos durante esses anos.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

MARQUES, Thiago Andrade. **Produção de lipase por um novo isolado de *Trichoderma koningii* e emprego do efluente de laticínio como meio de fermentação.** 2013. 110f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

Os objetivos desse trabalho foram otimizar a produção de lipase por um novo isolado do solo da floresta Amazônica, *Trichoderma koningii* e aplicar efluente de laticínio como meio de fermentação. Inicialmente foi avaliado o efeito de diferentes óleos vegetais (óleos de oliva, canola, soja, milho e girassol) e do tempo (24-168 horas). O óleo de oliva foi o melhor substrato para a produção de lipase (172,85 U/mL) seguido pelo óleo de canola (145,37 U/mL), soja (128,70 U/mL), milho (125,59 U/mL) e girassol (112,85 U/mL). Em relação ao tempo de fermentação, as maiores atividades enzimáticas ocorreram na fase logarítmica tardia (120 horas). Dois planejamentos fatoriais foram empregados para avaliar os efeitos dos componentes nutricionais e dos parâmetros físicos na produção de lipase. Diferentes concentrações de extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  não estimularam a produção da enzima, pois maiores produções foram obtidas na ausência desses componentes. A otimização dos níveis de temperatura, pH e agitação resultou na maior produção da enzima (175,20 U/mL), sendo obtida a 28 °C; pH 6,0 e 105 rpm. O extrato enzimático produzido nas condições ótimas foi caracterizado bioquimicamente e apresentou atividade máxima de lipase em 37 °C e pH 8,0, termoestabilidade até 65 °C, estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 8,0), em íons metálicos ( $\text{K}^+$ ;  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ba}^{+2}$ ) e solventes hidrofóbicos (querosene, n-dodecano, hexano). Visando um aumento na produção de lipase, o efluente de laticínio foi aplicado como meio de fermentação. O resíduo líquido utilizado apresentou as seguintes características: pH 9,0; DQO de 1.376,00 mg/L; lipídios totais de 70 mg/L; proteínas totais de 189,49 mg/L e açúcares totais de 55,83 mg/L. Para avaliar a produção da enzima no efluente foram realizadas duas fermentações, uma sem suplementação e outra com a suplementação de óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel. Nas fermentações sem suplementação foi observada uma baixa atividade enzimática (10,74 U/mL) e um baixo crescimento do microrganismo. A maior produção de lipase com a suplementação do efluente foi de 1.327,28 U/mL (aumento de 123 vezes) e ocorreu com 5 mL/L de óleo de oliva; 5,62 mL/L de Tween 80 e 15 mL/L de meio de Vogel. A alta produção obtida demonstrou a potencial aplicação do efluente de laticínio como meio de fermentação para a produção de enzimas e outras biomoléculas. O novo isolado de *T. koningii* mostrou ser um promissor produtor de lipase tanto em meio de Vogel como em efluente de laticínio.

**Palavras-chave:** Lipase. *Trichoderma koningii*. Metodologia de superfície de resposta. Efluente de laticínio. Delineamento experimental de misturas.

MARQUES, Thiago Andrade. **Lipase production by a new isolated of *Trichoderma koningii* and employment of dairy effluent as fermentation medium.** 2013. 110p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) –State University of Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

The aims of this work were to optimize lipase production by a new isolated from soil of the Amazon rainforest, *Trichoderma koningii* and apply dairy effluent as fermentation medium. Initially, the effect of different vegetable oils (olive, canola, soybean, corn and sunflower) and fermentation time (24-168 hours) was investigated. Olive oil was the best substrate for lipase production (172.85 U/ml), followed by canola (145.37 U/ml), soybean (128.70 U/ml), corn (125.59 U/ml) and sunflower (112.85 U/ml) oils. About the fermentation time, the highest enzymatic activities occurred in the late logarithmic phase (120 hours). Two experimental designs were applied to evaluate the components in the culture medium and the physical parameters. Different concentrations of yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  did not stimulate lipase production, because higher yields were obtained in the absence of these components. The optimization of the temperature levels, pH and agitation resulted in the maximum enzyme production (175.20 U/ml) obtained at 28 °C, pH 6.0 and 105 rpm. The enzymatic extract produced was characterized biochemically and showed maximum lipase activity at 37 °C and pH 8.0, thermostability up to 65 °C, stability in a wide pH range (3.0 to 8.0) in metal ions ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ba}^{+2}$ ) and hydrophobic solvent (kerosene, n-dodecane, hexane). Aiming an increase in lipase production the dairy effluent was applied as fermentation medium. The residue liquid had the following characteristics: pH 9.0, COD of 1,376.00 mg/l; total lipids 70 mg/l, total protein of 189.49 mg/l and total sugars 55.83 mg/l. To evaluate the enzyme production in the effluent, two fermentations were carried out, one without supplementation and another with supplementation of olive oil, Tween 80, glycerol and Vogel's medium. In fermentations without supplementation was observed a low enzyme activity (10.74 U/ml) and low microorganism growth. The highest lipase production with supplementation of the effluent was 1,327.28 U/mL (increased of 123 fold) and occurred at 5 ml/l olive oil, 5.62 ml/l Tween 80 and 15 ml/l Vogel's medium. The high production obtained demonstrated the potential application of dairy effluent as fermentation medium for production of enzymes and other biomolecules. The new isolated of *T. koningii* showed to be a promising lipase producer both in Vogel's medium as in dairy effluent.

**Key words:** Lipase. *Trichoderma koningii*. Response surface methodology. Dairy effluent. Experimental mixture design.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Efeito da temperatura na atividade de lipase do extrato enzimático de *T. koningii* incubado no pH 8,5 por 10 minutos. ....76
- Figura 2** – Efeito do pH na atividade de lipase do extrato enzimático de *T. koningii* incubado a 37 °C por 10 minutos. ....77
- Figura 3** – Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase residual (%) do extrato bruto enzimático de *T. koningii*, após 120 minutos de incubação.....79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Microrganismos produtores de lipases.....	16
<b>Tabela 2</b> –	Condições ótimas de temperatura e pH para atividade de lipase de diferentes microrganismos. ....	25
<b>Tabela 3</b> –	Aplicações das lipases em diferentes áreas industriais. ....	29
<b>Tabela 4</b> –	Meio de Vogel (VOGEL, 1956).....	33
<b>Tabela 5</b> –	Componentes da solução de elementos traços. ....	34
<b>Tabela 6</b> –	Planejamento fatorial fracionado $3^{(3-1)}$ para avaliação da influência da concentração (g/L) de extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na produção de lipase por <i>T. koningii</i> , em meio de Vogel suplementado com 10 mL/L de óleo de oliva, a 28 °C, 120 rpm por 120 horas. ....	36
<b>Tabela 7</b> –	Planejamento fatorial Box Behnken $3^3$ incompleto para avaliação do efeito da temperatura (°C), pH e agitação (rpm) na produção de lipase por <i>T. koningii</i> , em meio de Vogel suplementado com 10 mL/L de óleo de oliva por 120 horas. ....	37
<b>Tabela 8</b> –	Delineamento experimental de misturas para avaliação dos componentes, óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel na produção de lipase por <i>T. koningii</i> em efluente de laticínio, pH 6,0; 28 °C, 105 rpm e 120 horas.....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	111
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1 LIPASES: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	14
3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES .....	15
3.3 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO .....	17
3.3.1 Efeito dos Fatores Físicos .....	17
3.3.2 Efeito das Condições Nutricionais .....	19
3.3.3 Aplicação de Efluentes para Produção de Lipase .....	23
3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASE .....	25
3.4.1 Efeito da Temperatura e do pH .....	25
3.4.2 Efeito de Íons Metálicos .....	26
3.4.3 Efeito de Solventes Orgânicos e Detergentes .....	27
3.5 APLICAÇÕES .....	28
3.6 METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	30
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 MATERIAL .....	33
4.1.1 Microrganismo .....	33
4.1.2 Meios de Cultura .....	33
4.1.2.1 Meio de preservação e meio de inóculo .....	33
4.1.2.2 Meio de fermentação .....	33
4.1.3 Efluente de Laticínio .....	34
4.2 MÉTODOS .....	34
4.2.1 Preservação do Microrganismo .....	34
4.2.2 Inóculo .....	344

4.2.3 Avaliação das Condições de Fermentação para Produção de Lipase .....	35
4.2.3.1 Efeito de óleos vegetais na produção de lipase .....	35
4.2.3.2 Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase .....	35
4.2.3.3 Efeito do extrato de levedura, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e mgso <sub>4</sub> na produção de lipase .....	355
4.2.3.4 Efeito da temperatura, ph e agitação na produção de lipase .....	36
4.2.4 Fermentação para Produção de Lipase em Efluente de Lacticínio .....	37
4.2.5 Caracterização Bioquímica do Extrato Bruto Enzimático .....	38
4.2.5.1 Efeito da temperatura na atividade de lipase .....	38
4.2.5.2 Efeito do ph na atividade de lipase.....	39
4.2.5.3 Efeito de íons metálicos na atividade de lipase.....	39
4.2.5.4 Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase .....	39
4.2.6 Métodos Analíticos .....	40
4.2.6.1 Determinação da biomassa.....	40
4.2.6.2 Determinação da atividade de lipase.....	40
4.2.6.3 Caracterização do efluente.....	40
4.2.6.3.1 Determinação dos lipídios totais.....	40
4.2.6.3.2 Determinação das proteínas .....	41
4.2.6.3.3 Determinação dos açúcares totais .....	41
4.2.7 Análise Estatística .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
5.1 ARTIGO 1: OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY <i>TRICHODERMA KONINGII</i> ISOLATED FROM AMAZON RAINFOREST.....	43
5.2 ARTIGO 2: PRODUÇÃO DE LIPASE EM EFLUENTE DE LACTICÍNIO POR UM NOVO ISOLADO DE <i>TRICHODERMA KONINGII</i> .....	60
5.3 RESULTADOS COMPLEMENTARES.....	76
5.3.1 Caracterização Parcial do Extrato Bruto Enzimático .....	76
5.3.1.1 Efeito da temperatura e do ph na atividade de lipase .....	76
5.3.1.2 Efeito de íons metálicos na atividade de lipase.....	77
5.3.1.3 Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase .....	78
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81
<b>ANEXOS</b> .....	92
<b>ANEXO A</b> – Normas para a submissão do artigo para o periódico brazilian journal of microbiology .....	93
<b>ANEXO B</b> – Normas para a submissão do artigo para o periódico journal of molecular catalysis b: enzymatic. ....	99

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas contribui para o desenvolvimento sustentável da química industrial, devido às condições reacionais suaves e economia de energia do processo (LI; ZONG, 2010). O mercado de enzimas é ocupado principalmente pelas hidrolases, tais como as proteases, lipases e amilases (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

As lipases catalisam uma variedade de reações químicas, o que possibilita sua aplicação em diversas áreas industriais, como na produção de biodiesel (FEDOSOV et al., 2013), tratamento de efluentes (BASHEER et al., 2011), síntese de ésteres (ROMERO et al., 2012), adição em detergentes (ROMDHANE et al., 2010), síntese de aditivo alimentício (WANG et al., 2012), na síntese de emulsificantes para indústria de alimentos (H-KITTIKUN; KAEWTHONG; CHEIRSILP, 2008) e na produção de biolubrificantes (ÅKERMAN et al., 2011).

As lipases microbianas são as mais utilizadas industrialmente, por serem mais estáveis e possuem propriedades bem mais diversificadas que as lipases de outras fontes (CARVALHO et al., 2003). Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. são encontrados em solos florestais, agrícolas e na camada de húmus (WARDLE et al., 1993). Esse microrganismo tem sido utilizado para a produção de várias enzimas, tais como celulase (DELABONA et al., 2012), xilanase (ZHANG et al., 2012), lacase (BAILEY et al., 2007),  $\beta$ - glicosidase (LIN et al., 2010), hemicelulase e pectinase (OLSSON et al., 2003), porém pesquisas de produção de lipase por esse gênero têm sido pouco exploradas.

Os materiais lipídicos residuais gerados pelas práticas agrícolas e industriais são de difícil tratamento e baixo valor, entretanto eles podem ser utilizados como materiais para aplicações biotecnológicas, em particular para a síntese de metabólitos de alto valor, como por exemplo, ácidos orgânicos, biossurfactantes e lipases (MAFAKHER et al., 2010). As indústrias de laticínios são as mais poluentes entre as indústrias alimentícias, pois apresentam elevado consumo de água e geram grande quantidade de efluentes líquidos, de 1 a 6 litros de efluente para cada litro de leite produzido (MAGANHA, 2006; VOURCH et al., 2008). Esse tipo de resíduo apresenta alta concentração de matéria orgânica, como lipídios, proteínas e carboidratos, além de uma elevada concentração de sólidos em suspensão (FARIZOGLU; UZUNER, 2011). Dessa forma, se esses compostos não

forem removidos causam sérios problemas de poluição. O Brasil é o terceiro maior produtor de leite do mundo e alcançou uma produção de 30,7 bilhões de litros no ano de 2010 (IBGE, 2011). O descarte da grande quantidade de efluente gerado pode ser minimizado pela utilização desse resíduo como substrato em aplicações biotecnológicas, gerando produtos de interesse.

A estatística como ferramenta tem sido amplamente aplicada em pesquisas tecnológicas, visando uma economia, diminuição do trabalho e melhora na informação dos resultados obtidos nesses estudos (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995). A metodologia de superfície de resposta é aplicada para otimização dos componentes do meio de cultivo e outras variáveis críticas responsáveis pela produção de biomoléculas (YA-HONG et al., 2004). O delineamento experimental de misturas tem sido empregado na otimização de meios de fermentação (YIN et al., 2009), em pesquisas de extração de compostos químicos (SEABRA et al., 2012), na otimização da produção de enzimas (DELABONA et al., 2012; GIESE et al., 2011), entre outras aplicações. Um experimento de mistura é um tipo especial de delineamento experimental, em que os fatores são as proporções dos componentes em uma mistura e os seus níveis não são independentes uns dos outros (FLORES et al., 2010).

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar a produção de lipase por um novo isolado de *Trichoderma koningii* e a utilização do efluente de laticínio como meio de fermentação para obtenção de novas fontes de lipases, com características desejáveis para aplicação nas diferentes áreas industriais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de lipase por um novo isolado do solo da floresta Amazônica, *Trichoderma koningii* e aplicar efluente de laticínio como meio de fermentação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes óleos vegetais na produção de lipase de *T. koningii*;
- Verificar a influência do tempo de fermentação na produção da enzima;
- Investigar o efeito do extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4$  na produção de lipase;
- Avaliar a temperatura, pH e agitação na produção da enzima;
- Caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático produzido na condição ótima;
- Determinar a composição química do efluente de laticínio;
- Produzir lipase com alta atividade utilizando efluente de laticínio como meio de fermentação;
- Otimizar a produção de lipase de *T. koningii* no efluente com o emprego de um delineamento experimental de misturas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 LIPASES: DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS GERAIS

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C 3.1.1.3) catalisam a hidrólise total ou parcial de gorduras e óleos, ocorrendo à liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, monoacilglicerol e glicerol (VILLENEUVE et al., 2000). Essas enzimas se diferenciam das esterases (Carboxilesterases, E.C 3.1.1.1), que agem apenas em moléculas de éster solúveis em água (VERGER, 1997). Entretanto, a maioria das lipases pode realizar a hidrólise dos substratos das esterases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

A ativação interfacial é uma característica exclusiva das lipases e consiste no aumento da atividade da enzima em substratos insolúveis, como por exemplo, emulsões. Essa propriedade pode ser explicada pela presença de uma tampa hidrofóbica que cobre o sítio ativo, o qual sofre uma mudança conformacional na presença de uma interface lipídio-água (VERGER, 1997). De acordo com Costa e Amorim (1999), as lipases apresentam duas conformações, a fechada (enzima inativa) e a aberta (enzima ativa). Na conformação fechada o sítio ativo está totalmente coberto pela tampa hidrofóbica e na conformação aberta, a tampa é deslocada para fora do sítio ativo possibilitando a ligação do substrato.

O sítio ativo da lipase é formado por uma tríade catalítica dos aminoácidos serina, aspartato ou glutamato e histidina, sendo que geralmente é encontrada uma sequência consenso (Gly-x-Ser-x-Gly) em volta do sítio ativo. A hidrólise do substrato inicia-se com um ataque nucleofílico pelo sítio catalítico no átomo de carbono do grupo carbonila da ligação éster, sendo liberado um álcool e restando um complexo acil-lipase. Posteriormente, esse complexo é hidrolisado ocorrendo a liberação do ácido graxo e a regeneração da enzima (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004; JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases são  $\alpha/\beta$  proteínas, constituídas por um domínio de folhas  $\beta$ -pregueadas, dispostas paralelamente, interligadas e circundadas por  $\alpha$ -hélices. O nucleófilo catalítico (resíduo de serina) está situado no lado C-terminal das fitas  $\beta$ -5 de um pentapeptídeo altamente conservado, que compõem o ângulo nucleofílico posicionado entre uma estrutura  $\beta$  e  $\alpha$  hélice (JAEGER; REETZ, 1998).

De acordo com a especificidade em relação ao substrato, as lipases têm sido divididas em três grupos: regioseletivas, tipo-seletivas e enantioseletivas. As regioseletivas são subdivididas em: lipases 1,3 específicas, as quais hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, ou seja, na posição 1 ou 3; as lipases não específicas: catalisam a hidrólise de triacilglicerídeo de modo aleatório, liberando ácidos graxos na posição 1(3) ou 2. As lipases tipo-seletivas agem de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e/ou ao número de insaturação da cadeia acila. As enantioseletivas apresentam a especificidade de agir em apenas em um dos tipos dos enantiômeros em uma mistura racêmica (CARVALHO et al., 2003; PAQUES; MACEDO, 2006).

Além de catalisar as reações de hidrólise de triacilgliceróis, as lipases também catalisam outros tipos de reações químicas como esterificação e interesterificação (acidólise, alcoólise ou transesterificação). A reação de esterificação ocorre entre alcoóis poliídricos e ácidos graxos livres, sendo a reação inversa da hidrólise do acilglicerol correspondente. Nas reações de interesterificação, as lipases catalisam a reação de um triacilglicerol com um ácido graxo (acidólise), um álcool (alcoólise) ou outro éster (transesterificação), formando um rearranjo na distribuição dos ácidos graxos do triacilglicerol, assim, ocorre a síntese de um novo triacilglicerol com novas propriedades químicas e físicas (DALLA-VECCHIA et al., 2005; CARVALHO et al., 2003).

### 3.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASES

As lipases apresentam diversas fontes na natureza, sendo produzidas por várias plantas, animais e microrganismos. As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas (GUPTA; GUPTA; RATHI, 2004). Existem diversas características das lipases microbianas que possibilitam seu enorme potencial biotecnológico como: estabilidade em solventes orgânicos, não requererem cofatores e possuem uma especificidade ampla de substrato (JAEGER; REETZ, 1998). Na Tabela 1 estão apresentadas várias espécies de microrganismos produtores de lipases.

**Tabela 1**– Microrganismos produtores de lipases.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Referência</b>
<i>Antrodia cinnamomea</i>	LIN; WANG; SUNG, 2006
<i>Aspergillus carneus</i>	KAUSHIK et al., 2006
<i>Aspergillus niger</i>	ROMERO et al., 2012
<i>Bacillus pumilus</i>	KUMAR et al., 2011a
<i>Botryosphaeria ribis</i>	MESSIAS et al., 2009
<i>Burkholderia multivorans</i>	DANDEVATE et al., 2009
<i>Burkholderia</i> sp.	LIU et al., 2012
<i>Candida cylindracea</i>	SALIHU et al., 2011a
<i>Candida</i> sp.	TAN et al., 2003
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	SÁNCHEZ-OTERO et al., 2011
<i>Geotrichum candidum</i>	MALDONADO et al., 2012
<i>Penicillium verrucosum</i>	PINHEIRO et al., 2008
<i>Pseudomonas gessardii</i>	RAMANI et al., 2010
<i>Rhizopus arrhizus</i>	RAJENDRAN; THANGAVELU, 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	HORCHANI et al., 2009
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	HASAN-BEIKDASHTI et al., 2012
<i>Streptomyces</i> sp.	MANDER et al., 2012
<i>Trichoderma harzianum</i>	ÜLKER et al., 2011
<i>Trichoderma viride</i>	KASHMIRI; ADNAN; BUTT, 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i>	TURKI et al., 2009

Os fungos do gênero *Trichoderma* são filamentosos, pertencentes aos Deuteromicetos, sendo principalmente encontrados em solos de todos os tipos, inclusive nos florestais, nos agrícolas e na camada de húmus (WARDLE; PARKINSON; WALLER, 1993). Os membros desse gênero podem ser de vida livre no solo, oportunistas, simbioses com plantas e parasitas de outros fungos (HARMAN et al., 2004; HARMAN, 2006).

As espécies de *Trichoderma* possuem alta taxa de reprodução, capacidade de sobreviver em condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes e demonstram preferência pela temperatura e teor de umidade dos solos florestais (DANIELSON; DAVEY, 1973; WARDLE; PARKINSON; WALLER, 1993;

WOO et al., 2005). Esse microrganismo é relatado como agente para controle de fungos patogênicos de plantas e apresenta a capacidade de promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas (SAMUELS, 2006). O gênero também é reportado na literatura, como produtor de várias enzimas como celulase (DELABONA et al., 2012), xilanase (ZHANG et al., 2012), lacase (BAILEY et al., 2007),  $\beta$ - glicosidase (LIN et al., 2010), hemicelulase e pectinase (OLSSON et al., 2003).

Em relação à produção de lipase existem poucos trabalhos na literatura, que relatam a síntese dessa enzima pelo gênero *Trichoderma* sp. Kashmiri, Adnan e Butt (2006) realizaram a purificação e a caracterização parcial da lipase produzida por *T. viride*. Os autores avaliaram a relação entre a formação de biomassa e produção de lipase. O microrganismo foi cultivado em óleo de oliva na concentração de 20 g/L, a 30 °C, em 100 rpm por 72 horas. A melhor produção de lipase extracelular obtida foi de 7,3 U/mL em 48 horas. A concentração máxima de biomassa foi de 13,6 g/L e ocorreu em 60 horas. Ülker et al. (2011) verificaram o efeito de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *T. harzianum*. O microrganismo foi cultivado a 30°C, em 150 rpm por 7 dias. A maior atividade de lipase foi de 0,24 U/mL e ocorreu no meio de cultivo com glicose e peptona. A maior concentração de biomassa (1,25 g/L) ocorreu em 7 dias de cultivo.

### 3.3 PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO

#### 3.3.1 Efeito dos Fatores Físicos

A biossíntese de lipase pode ser influenciada por diversos fatores físicos, Liu et al. (2011) reportaram que a velocidade de agitação é considerada um fator importante na produção de lipase. O aumento da velocidade de agitação melhora a taxa de transferência de oxigênio e a mistura do meio de cultivo, permitindo assim, um aumento do crescimento celular e da produção de lipase. Entretanto, níveis de agitação muito elevados provocam uma maior força de cisalhamento, o que pode causar efeitos negativos no crescimento celular e na atividade enzimática. Esses autores testaram diferentes velocidades de agitação (50 a 400 rpm) na produção de lipase por *Burkholderia* sp. e observaram que esse parâmetro do processo fermentativo apresentou efeito significativo sobre a produtividade de lipase e o crescimento celular. A máxima produtividade foi obtida

em 100 rpm, sendo que o aumento na velocidade de agitação provocou uma diminuição na produtividade de lipase.

Cihangir e Sarikaya (2004) investigaram o efeito da agitação sobre a atividade de lipase produzida por *Aspergillus* sp. Uma parte dos experimentos foi incubada a 29 °C, em 150 rpm por 4 dias, enquanto a outra parte foi incubada sob condições estacionárias. Os cultivos conduzidos com agitação apresentaram atividade enzimática de 16,50 U/mL, enquanto os cultivos sem agitação atingiram 6,32 U/mL. Os autores reportaram que a agitação também influenciou a produção de biomassa, sendo que ocorreu um maior crescimento celular na condição com agitação.

A temperatura de incubação do meio de cultivo também é um dos fatores críticos para a produção de lipase. No entanto, esse parâmetro varia entre os organismos (RAMANI et al., 2010). Sharma, Bardhan e Patel (2009) realizaram a otimização dos parâmetros físicos na produção de lipase de *Arthrobacter* sp. Os autores estudaram os efeitos de diferentes valores de pH (8,0; 9,0 e 10,0), temperaturas (40, 60 e 80 °C) e tempos de cultivo (12, 30 e 48 horas), empregando um delineamento composto central com 20 ensaios. A condição ótima verificada para produção de lipase foi a 40 °C, pH 10,0 e 48 horas, apresentando uma atividade de lipase de 13,75 U/mL. As três variáveis influenciaram significativamente a produção de lipase.

Yadav et al. (2011) avaliaram os efeitos da temperatura e do pH inicial na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica* e verificaram que as melhores produções de lipase foram obtidas a 20 °C e pH 6,0. Kumar et al. (2005) estudaram o efeito do pH inicial na produção de lipase por *B. coagulans* e obtiveram a produção máxima da enzima no pH 8,5 em 55 °C.

Stergiou et al. (2012) otimizaram os níveis de temperatura (20 a 40 °C) e pH (5,5 a 7,5) empregando um planejamento fatorial completo 3<sup>2</sup>, com 18 ensaios, na produção de lipase por *Kluyveromyces marxianus*. A maior produção da enzima foi de 0,175 U/mL e ocorreu em 32,5 °C e no pH 6,4. A produção alcançada nas condições otimizadas representou um aumento de 18 vezes, comparada com a produção verificada sem a otimização das condições de cultivo.

### 3.3.2 Efeito das Condições Nutricionais

Os microrganismos estão expostos à uma variedade de condições nutricionais e físicas, as quais alteram o rendimento da produção de lipase, induzindo ou reprimindo. Assim, para o desenvolvimento de um meio de produção econômico é necessário a seleção de fontes de carbono e nitrogênio, que possibilitam o crescimento do microrganismo e o máximo rendimento do produto (HASAN; SHAH; AHMEED, 2006).

A fonte de carbono e a fonte de nitrogênio consistem nos principais parâmetros fermentativos que influenciam na produção de lipase. Kantak et al. (2011) estudaram a produção de lipase por *Rhizopus* sp. com várias fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, óleo de oliva e glicerol) e fontes de nitrogênio (peptona, triptona, aminoácidos da caseína, extrato de levedura e licor de milho). Os resultados indicaram que a melhor fonte de carbono foi a glicose e de nitrogênio foi o licor de milho. A máxima atividade obtida com esses dois componentes (870 U/mL) representou um aumento de 16 vezes na atividade de lipase, quando comparada com o meio basal sem fonte de carbono e nitrogênio.

Um dos fatores mais importantes para o aumento da atividade de lipase é a fonte de carbono, pois essas enzimas são indutivas e geralmente são produzidas na presença de lipídios como fonte de carbono, como por exemplo, óleos (KUMAR et al., 2011a). Lima et al. (2003) avaliaram diferentes óleos vegetais (óleo de oliva, milho, soja e girassol), na concentração de 1% (v/v) e a glicose (1,8 %, v/v) como fonte de carbono na produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum*. O cultivo com óleo de oliva apresentou a melhor produção da enzima. Os autores relacionaram essa melhor produção de lipase com o alto teor de ácido oléico (C18:1) do óleo de oliva, enquanto os óleos de milho, soja e girassol apresentam maior teor de ácido linoléico (C18:2). O cultivo realizado com glicose não apresentou atividade enzimática, confirmando que o fungo necessita de um indutor lipídico para a produção de lipase.

Wang, Xu e Shan (2008) testaram o efeito dos óleos de oliva, soja e girassol na produção de lipase. A máxima produção de lipase ocorreu no cultivo com óleo de oliva, sendo 65 % maior do que a produção do cultivo controle (sem óleo vegetal). De acordo com os autores, a melhor produção de lipase estaria correlacionada com a alta concentração de ácido oléico do óleo oliva. O óleo de

oliva apresenta 71 % de ácido oléico, 13 % de ácido palmítico e 10 % de ácido linoléico. O óleo de soja é composto por 24 % de ácido oléico, 11 % de ácido palmítico e 54 % de ácido linoleico e o óleo de girassol é formado por 19 % de ácido oléico, 7 % de ácido palmítico e 68 % de ácido linoléico.

Dandavate et al. (2009) avaliaram o efeito dos óleos de mamona, oliva, milho e amendoim na produção de lipase por *Burkholderia multivorans*. A melhor produção foi observada no cultivo com óleo de oliva, que apresenta maior proporção de ácidos graxos de cadeia longa do que os outros óleos testados. Assim, foi sugerido que a lipase produzida apresenta maior especificidade por esse tipo de ácidos graxos.

Messias et al. (2009) verificaram o efeito de diferentes óleos vegetais na produção de lipase por várias espécies do fungo *Botryosphaeria*. Foram testados os óleos de babaçu, canola, oliva, sésamo, girassol, milho e de semente de algodão na concentração de 1 % (v/v). O meio de fermentação contendo óleo de soja apresentou a melhor produção de lipase entre todos os óleos vegetais testados, na temperatura de 28 °C, agitação de 180 rpm e 5 dias de cultivo.

Papagora, Roukas e Kotzekidou (2013) testaram diferentes concentrações de glicose (1; 10 e 19 g/L) e de óleo de oliva (1; 15 e 29 g/L) na produção de lipase por *Debaryomyces hansenii*. Um delineamento composto central com 20 ensaios foi utilizado e a análise estatística indicou que o óleo de oliva apresentou efeito positivo e foi a variável que mais influenciou na produção da enzima. As condições ótimas foram determinadas: 1,0 g/L de glicose; 19 g/L de óleo oliva e pH 6,4 e a atividade de lipase observada foi de 7,44 U/mL (aumento de 2,28 vezes na produção da enzima).

Os surfactantes Tween (20, 40, 60 e 80), Triton X-100, entre outros, podem aumentar a permeabilidade celular aumentando dessa forma a secreção de diversas moléculas através da membrana celular (SILVA et al., 2005). Esses compostos podem ser utilizados como a única fonte de carbono para a produção de lipase, pois apresentam ácidos graxos em sua composição química (MESSIAS et al., 2009). Segundo Ramani et al.(2010), a adição de surfactante no meio de cultivo pode aumentar tanto a atividade como a estabilidade da enzima.

Silva et al. (2005) avaliaram a produção de lipase por *Metarhizium anisopliae* empregando diferentes fontes lipídicas e verificaram que a maior concentração de biomassa ocorreu com óleo de girassol e a melhor produção de

lipase com óleo de oliva. Os autores também investigaram se a adição de surfactantes poderia aumentar a permeabilidade celular, dessa forma, aumentar a secreção de enzimas ou facilitar o contato entre enzima e substrato. Os autores concluíram que as maiores atividades de lipase foram observadas na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween 80.

A influência da fonte do nitrogênio inorgânica ou orgânica sobre a produção de lipase tem sido muito estudada. Tan et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas sobre a produção de lipase de *Candida* sp. Os resultados da atividade de lipase demonstraram que a caseína (3400 U/mL) e a farinha de soja (3200 U/mL), em uma concentração de 6 % (p/v) apresentaram o melhor efeito sobre a atividade de lipase. Em relação às fontes inorgânicas testadas, o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (sulfato de amônio) em uma concentração de 0,1 % (p/v) demonstrou a melhor produção de lipase (3400 U/mL).

Gupta, Mehra e Gupta (2004) relataram a influência da fonte de nitrogênio na produção de lipase por *Bacillus* sp. Os autores concluíram que fontes orgânicas de nitrogênio estimularam significativamente a produção da enzima, por esses microrganismos. Hasan, Shah e Hameed (2006) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio na produção de lipase por *Bacillus* sp. Foram testados o extrato de levedura, triptona, peptona e extrato de carne. Os resultados demonstraram que o extrato de levedura como fonte de nitrogênio proporcionou a melhor produção de lipase (24 U/mg).

Turki et al. (2009) estudaram o efeito de fontes orgânicas de nitrogênio na produção de lipase por *Yarrowia lipolytica*. O extrato de levedura, peptona, triptona e caseína foram adicionados separadamente em um meio mineral basal, em uma concentração de 10 g/L. Após 72 horas de cultivo, a atividade específica de lipase foi determinada e comparada com o controle (sem fonte de nitrogênio). Os autores relataram que independentemente da fonte orgânica testada ocorreu um aumento na produção de lipase, comparado com o meio mineral basal. Todavia, a peptona e a triptona demonstraram um maior efeito estimulatório na produção de lipase.

Ramani et al. (2010) reportaram o efeito negativo da peptona,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e ureia na produção de lipase por *P. gessardii*. Segundo os autores, as proteases liberadas pela adição de fontes de nitrogênio no meio de cultivo, podem ter causado a desnaturação da lipase produzida. Hasan-Beikdashti et

al. (2012) realizaram a seleção de vários componentes do meio de cultivo para produção de lipase por *Stenotrophomonas maltophilia*. Dentre os fatores avaliados apenas a peptona e o extrato de levedura influenciaram significativamente a síntese da enzima e as concentrações ótimas das duas variáveis foram: 4 g/L e 2 g/L, respectivamente.

Bora e Bora (2012) estudaram o efeito de várias fontes de nitrogênio (caseína, extrato de levedura, extrato de malte, extrato de carne, peptona e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) na produção de lipase de *Bacillus* sp. Os resultados mostraram que o microrganismo cresceu bem em todas as fontes de nitrogênio testadas, porém a maior produção de lipase (20 U/mL) foi verificada nos cultivos com peptona. Liu et al. (2012) testaram fontes de nitrogênio inorgânicas ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) e orgânicas (extrato de levedura e ureia) na produção de lipase por *Burkholderia* sp. A máxima atividade entre todos componentes testados foi de 17,2 U/mL, com o  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Entre as fontes de nitrogênio orgânicas, a maior produção da enzima foi verificada com extrato de levedura, porém o aumento da concentração acima de 2 g/L, causou a redução da produção de lipase.

Sais minerais podem apresentar efeito positivo na produção de lipase, como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (KUMAR et al., 2011a),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (LIMA et al., 2003)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (RAJENDRAN; THANGAVELU, 2009).

Lin; Wang e Sung (2006) investigaram os efeitos dos sais,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{FeCl}_3$ , na produção de lipase de *Antrodia cinnamomea*. O meio de cultivo foi suplementado com os sais na concentração de 0,1 % (p/v). As melhores produções ocorreram nos cultivos com  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{CaCl}_2$ . A melhor produção de lipase, 6,64 U/mL, ocorreu no cultivo com  $\text{KCl}$  e o ensaio com  $\text{FeCl}_3$  apresentou uma baixa atividade enzimática, de 2,22 U/mL.

Ruchi, Anshu e Khare (2008) realizaram a otimização do meio de cultivo para produção de lipase por *P. aeruginosa* empregando um planejamento fatorial. Os sais  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$  e  $\text{NaCl}$  foram adicionados ao meio de cultivo variando a concentração de 0,02 a 0,2 % (p/v). Somente  $\text{MgSO}_4$  apresentou efeito positivo. A produção de lipase por *P. gessardii* foi levemente inibida com a suplementação dos sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  e  $\text{FeSO}_4$  (0,1 % p/v), no meio de fermentação. O  $\text{CaCl}_2$  apresentou efeito estimulador na produção da enzima (RAMANI et al., 2010).

### 3.3.3 Aplicação de Efluentes para Produção de Lipase

Pesquisas que visam à utilização de diferentes microrganismos, suplementos e substratos na produção de lipase podem contribuir na obtenção de lipase com alto valor e com menores custos de produção em escala industrial (RIGO et al., 2010). Dessa forma, a utilização de efluentes industriais como meio de fermentação para produção de lipase pode ser uma alternativa para diminuir o custo de produção da enzima.

D'Annibale et al. (2006b) selecionaram várias cepas de fungos (*Geotrichum candidum*, *R. arrhizus*, *R. oryzae*, *A. oryzae*, *A. niger*, *C. cylindracea* e *P. citrinum*) para produção de lipase em efluente da indústria de óleo de oliva. Com a melhor cepa produtora de lipase foi avaliada a suplementação do efluente com diferentes fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  e ureia) e óleos vegetais (óleo de milho, oliva e soja). A melhor atividade de lipase foi de 9,23 U/mL e ocorreu quando *C. cylindracea* foi cultivada no efluente suplementado com óleo de oliva (3,0 g/L) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (2,4 g/L).

D'Annibale et al. (2006a) investigaram o efeito de várias fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$  e ureia) e de óleos vegetais (óleo de milho, oliva e soja) na produção de lipase por *P. citrinum*, em efluente da indústria de óleo oliva. A adição da fonte de nitrogênio  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , levou a um aumento significativo na produção da enzima, porém a adição de óleos vegetais ao efluente, não afetou a produção. Os autores também otimizaram a produção empregando um delineamento composto central, com 17 ensaios, variando o pH inicial e as concentrações de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e extrato de levedura. A máxima atividade de lipase alcançada foi de 1,272 U/mL (3,0 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1,0 g/L de extrato de levedura, pH 6,1), após 188 horas de fermentação.

Brozzoli et al. (2009) realizaram a produção de lipase por *C. cylindracea* empregando resíduo da indústria de óleo de oliva como meio de cultivo. A produção da enzima foi avaliada sem suplementação e com o efluente suplementado com óleo de oliva mais outras fontes de carbono (glicose e Tween 80) e de nitrogênio (extrato de levedura, extrato de malte e peptona). A maior produção de lipase (9,48 U/mL) foi obtida quando o efluente foi suplementado com 3,0 g/L de óleo de oliva e com 0,5 g/L de extrato de levedura. A máxima atividade (3,20 U/mL) encontrada sem suplementação foi 2,96 vezes menor.

Salihu et al. (2011a) otimizaram a produção de lipase por *C. cylindracea* com o efluente da indústria de óleo de palma, como meio de cultivo. Empregando modelos estatísticos, os autores selecionaram os componentes do meio (glicose, peptona, Tween 80, extrato de levedura, extrato de malte, óleo de oliva,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), que influenciaram significativamente a síntese da enzima. Os resultados observados demonstraram que apenas Tween 80 e a peptona foram significativos. O meio otimizado com 0,45 % (p/v) de peptona e 0,65 % (v/v) de Tween 80 levou a produção máxima de lipase de 20,26 U/mL, a qual foi maior 5,19 vezes, do que a produção da enzima obtida com o meio não otimizado.

Os resíduos industriais sólidos também são utilizados para a produção de lipase, como descrito por Santis-Navarro et al. (2011) que utilizaram resíduo sólido da indústria de óleos vegetais como substrato e Kumar et al. (2011b) que aplicaram resíduo de graxa suplementado com farelo de trigo na produção de lipase por *P. chrysogenum*. Damaso et al. (2008) produziram lipase por fermentação em estado sólido utilizando como substrato, resíduo agroindustrial (farelo de trigo ou espiga de milho) suplementado com subprodutos de refino do óleo de oliva. A produção da enzima por *A. niger* foi avaliada utilizando os dois substratos e a máxima atividade enzimática (48,6 U/g de substrato seco) foi observada com farelo de trigo. Posteriormente, três subprodutos industriais do refino do óleo de milho (borra, estearina e ácidos graxos) foram avaliados como substitutos do óleo de oliva. Os resultados indicaram que a borra (62,7 U/g de substrato seco) e a estearina (37,7 U/g de substrato seco) estimularam a produção de lipase, enquanto os ácidos graxos apresentaram um efeito inibidor (4,1 U/g de substrato seco).

Rigo et al. (2010) investigaram a síntese de lipase por fermentação em estado sólido em farelo de soja, resíduo da extração de óleo de soja, suplementado com diferentes fontes de carbono (óleo de soja e melaço de cana-de-açúcar) e nitrogênio (extrato de levedura e ureia). A máxima atividade enzimática, 203.72 U/g de substrato seco, foi obtida com a suplementação do resíduo com óleo de soja (1 g/100 g de substrato seco) e ureia (3 g/100 g de substrato seco), após 120 horas de fermentação.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE LIPASE

#### 3.4.1 Efeito da Temperatura e do pH

As condições ótimas de temperatura e pH na atividade de lipase variam de acordo com o microrganismo. A Tabela 2 foi elaborada de acordo com os dados de diferentes autores, os quais descreveram que a temperatura ótima pode variar de 15 a 60 °C e o pH ótimo de 2,5 a 10, de acordo com a cepa estudada. Algumas lipases apresentam máxima atividade acima de 50 °C, como a lipase de *B. thermoleovorans* (CASTRO-OCHOA et al., 2005), *B.coagulans* (KUMAR et al., 2005) e *Thermomyces lanuginosus* (ZHENG et al., 2011). Existem também lipases que apresentam melhor atividade em menores temperaturas, como a lipase de *Pseudomonas* sp., a qual apresenta máxima atividade em 20 °C (YU et al., 2009).

**Tabela 2** – Condições ótimas de temperatura e pH para atividade de lipase de diferentes microrganismos.

Microrganismo	pH	Temperatura	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	2,5	50 °C	MEHTRAS; BASTAWDE; GOKHALE, 2009
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8,5	35 °C	LIU et al., 2008
<i>Bacillus coagulans</i>	8,5	55 °C	KUMAR et al., 2005
<i>Bacillus thermoleovorans</i>	9-10	60 °C	CASTRO-OCHOA et al., 2005
<i>Geobacillus</i> sp.	7	50 °C	LI; ZHANG, 2005
<i>Geotrichum</i> sp.	9,5	15-20 °C	CAI et al., 2009
<i>Mucor racemosus</i>	5	40 °C	MOHAMED et al.,2011
<i>Penicillium</i> sp.	5,5	45 °C	DHEEMAN et al.,2011
<i>Penicillium</i> sp.	7	37 °C	WOLSKI et al., 2009
<i>Pseudomonas Gessardii</i>	5	30 °C	RAMANI et al., 2010
<i>Pseudomonas</i> sp.	7,5-8	20 °C	YU et al., 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5	55 °C	HORCHANI et al., 2009
<i>Staphylococcus xylosus</i>	8,2	45 °C	MOSBAH et al., 2005

<i>Thermomyces lanuginosus</i>	9	60 °C	ZHENG et al., 2011
<i>Yarrowia lipolytica</i>	5	25 °C	YADAV et al., 2011

O estudo da estabilidade térmica é realizado para definir aplicações e conhecer as características das enzimas. Dheeman et al. (2011) definiram para a lipase de *Penicillium* sp., que a temperatura ótima foi de 45 °C e demonstrou termoestabilidade nessa temperatura durante 3 horas de incubação.

As lipases são divididas em alcalinas e ácidas, de acordo com seu pH ótimo de atividade. A maioria das lipases apresentam melhor atividade em pH alcalino (Tabela 2). Castro-Ochoa et al. (2005) verificaram em seus estudos que a melhor atividade da lipase produzida por *B. thermoleovorans* ocorreu na faixa de pH 9-10. Entre as lipases ácidas destaca-se a produzida por *A. niger*, que segundo Mehtras, Bastawde e Gokhale (2009) demonstrou melhor atividade no valor de pH extremamente ácido de 2,5.

A estabilidade em diferentes valores de pH é uma importante propriedade das enzimas para possíveis aplicações industriais. Tayyab, Rashid e Akhtar (2011) relataram a estabilidade em uma ampla faixa de pH 6-12 da lipase de *Geobacillus* sp. Segundo os autores, essa característica da enzima potencializa a sua aplicação industrial. Li et al. (2011b) reportaram que a lipase de *R. oryzae* manteve 80 % da atividade enzimática, quando incubada na faixa de pH de 5,0 a 9,0 por 24 horas. Entretanto, a partir do pH 9,0 a enzima perdeu atividade drasticamente.

### 3.4.2 Efeito de Íons Metálicos

Os íons metálicos influenciam na atividade de lipase pela mudança de solubilidade dos ácidos graxos ionizados, bem como pela alteração das propriedades catalíticas da enzima (LESUISSE, SCHANCK; COLSON, 1993).

Mohamed et al. (2011) estudaram o efeito positivo de  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$  e  $Mn^{+2}$ , e o efeito negativo de  $Pb^{+2}$  na atividade de lipase de *M. racemosus*. Ülker e Karaoğlu (2012) descreveram que  $Mn^{+2}$  aumentou em 5% a atividade de lipase de *M. hiemalis*. Enquanto  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Hg^{+2}$  e  $Cr^{+3}$  inibiram levemente a atividade da enzima. Yoo et al. (2011) avaliaram o efeito de vários íons na atividade lipolítica

de *Ralstonia* sp. e os autores reportaram o efeito positivo de 55 % na presença do  $\text{Ca}^{+2}$  e a inibição da atividade da enzima, quando incubada com  $\text{Fe}^{+2}$ .

A lipase de *Burkholderia multivorans* demonstrou um aumento de atividade quando incubada com os íons de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , e uma redução quando incubada com  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Zn}^{+2}$  (Dandavate et al., 2009). Yu, Qin e Tan (2007) relataram o efeito positivo do  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  na atividade de lipase produzida por *Y. lipolytica*. Os autores sugeriram que o  $\text{Ca}^{+2}$  apresenta um efeito ativador sobre a enzima, concentrando-a na interface lipídio/água. Segundo Yadav et al. (2011) íons metálicos como  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  são ativadores da lipase, pois eles formam complexos com ácidos graxos ionizados o que altera o comportamento e a estabilidade da interface lipídio/água.

### 3.4.3 Efeito de Solventes Orgânicos e Detergentes

O estudo da estabilidade de enzimas frente a solventes orgânicos é fundamental, pois esses compostos químicos são utilizados em muitos processos industriais. De acordo com Hernández-Rodríguez et al. (2009), além da atividade enzimática, a estabilidade de lipases em solventes orgânicos é um parâmetro importante para sua aplicação industrial. Autores comprovaram a estabilidade da lipase em solventes orgânicos, principalmente em solventes hidrofóbicos (CADIRCI; YASA, 2010; LI et al., 2011a; LIMA et al., 2004; ROMERO et al., 2012).

Ruchi, Anshu e Khare (2008) verificaram a estabilidade da lipase produzida por *P. aeruginosa* nos solventes orgânicos: isopropanol, acetona, acetonitrila, n-butanol, hexano, entre outros. A lipase produzida por *P. aeruginosa* exibiu estabilidade na maioria dos solventes hidrofóbicos e não perdeu atividade até 72 horas. Entretanto, em solventes hidrofílicos a enzima apresentou uma queda drástica na atividade de lipase. Messias et al. (2009) também relataram maior estabilidade da lipase produzida por *Botryosphaeria ribis*, na presença de um solvente hidrofóbico, o isooctano 99,3 % (v/v). A enzima apresentou uma atividade residual de 68 %, comparada com um controle sem solvente orgânico. Os autores concluíram que solventes hidrofílicos como a acetona e o éter reduzem a atividade enzimática.

A lipase de *Streptomyces* sp. apresentou aumento na atividade de 79 e 73 %, quando incubada com hexano e octano, respectivamente. De forma

geral, solventes hidrofílicos interferem mais na estabilidade de lipase e o aumento da atividade enzimática na presença de solventes hidrofóbicos pode ser explicado pelo fato de que esses solventes, não retiram facilmente a molécula de água necessária para a conformação ativa da enzima (MANDER et al., 2012).

Dheeman et al. (2011) estudaram os efeitos de solventes orgânicos na atividade de lipase de *Penicillium* sp. Os solventes testados foram: Dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), metanol, etanol, 2-propanol, n-butanol, n-heptano, tolueno, p-xileno, n-hexano, isooctano e o dodecano. A enzima apresentou estabilidade na presença de solventes hidrofóbicos, tais como o tolueno, n-xileno, n-hexano, isooctano e dodecano. No entanto, nos solventes hidrofílicos dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), metanol, etanol, isopropanol e n-butanol, a enzima demonstrou redução na atividade residual de lipase. Devido à estabilidade que a enzima demonstrou, os autores concluíram que a lipase produzida apresenta potencial aplicação na produção de biodiesel e na biodegradação de vazamentos de óleo no ambiente.

Os surfactantes podem alterar a estrutura e a função de diferentes enzimas, incluindo as lipases (EBRAHIMPOUR et al., 2011). Mander et al. (2012) reportaram o efeito positivo na atividade de lipase dos detergentes Triton X-100, Tween 20 e 80. Os detergentes aniônicos, como o SDS, inibiram levemente a atividade da enzima. De acordo com os autores, os detergentes não iônicos enfraquecem a interação hidrofóbica entre as proteínas, causando a sua desagregação, e assim, estimulam a atividade da enzima.

### 3.5 APLICAÇÕES

As lipases microbianas por apresentarem grande variedade de atividades catalíticas, rendimentos elevados, facilidade de manipulação genética, não sofrerem flutuações sazonais e o rápido crescimento dos microrganismos em meios de cultivo de baixo custo, tornam essas enzimas mais interessantes para aplicação industrial, comprada as características das lipases de origem vegetal e animal (FANG et al., 2009).

O potencial catalítico das lipases é enorme, pois, essas enzimas podem ser aplicadas como biocatalisadores na área de química orgânica, em preparações farmacêuticas e de química fina, e na produção de aditivos alimentares

(CIHANGIR; SARIKAYA, 2004). O emprego de lipases na produção de biodiesel tem sido muito estudado (VERDUGO, 2011; ZHANG, 2011). O biodiesel é produzido pela reação química de um óleo vegetal ou gordura animal com um álcool. A produção desse tipo de combustível com a utilização de lipases apresenta algumas vantagens, por serem menos poluentes que os catalisadores químicos, as enzimas requerem temperaturas baixas, assim não há degradação do produto e ocorre redução dos custos de energia (YOO, et al., 2011). Na Tabela 3 são descritas algumas aplicações das lipases como a degradação de policarbonatos, síntese de diferentes ésteres, produção de biodiesel e produção de biossensor.

**Tabela 3** – Aplicações das lipases em diferentes áreas industriais.

<b>Aplicações das Lipases</b>	<b>Aplicação na Indústria</b>	<b>Referências</b>
Adição em detergentes	Detergentes para roupas	ROMDHANE et al., 2010.
Degradação de policarbonatos	Biodegradação de termoplásticos	ARTHAM et al., 2011
Produção de biodiesel	Biocombustíveis	YOO et al., 2011
Produção de biossensor	Biosensoriamento de analitos insolúveis em água	PAULIUKAITE et al., 2011
Produção de oleato de trimetilolpropano (ésteres de ácido oléico)	Biolubrificantes	ÅKERMAN et al., 2011
Produção de monoacilglicerol	Emulsificantes na indústria de alimentos e farmacêutica	H-KITTIKUN; KAEWTHONG; CHEIRSILP, 2008
Síntese de caprilato etílico	Aditivos alimentares	AHMED; RAGHAVENDRA; MADAMWAR, 2010
Síntese de ésteres de cera	Medicamentos e cosméticos	GUNCHEVA et al., 2011
Tratamentos de efluentes contaminados com diferentes óleos	Biorremediação	BASHEER et al., 2011

### 3.6 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

A utilização da estatística como ferramenta tem sido amplamente aplicada em pesquisas tecnológicas, visando uma economia, diminuição do trabalho e melhora na informação dos resultados obtidos nesses estudos (BARROS; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Os experimentos estatisticamente planejados reduzem o conjunto de experimentos e permite o estudo de muitas variáveis simultaneamente com um número reduzido de observações, economizando tempo e custos. O Delineamento experimental fornece uma linguagem universal com a qual pessoas de diferentes áreas podem se comunicar para a definição, execução e análise de experimentos (MONTGOMERY, 2001; MYERS; MONTGOMERY, 2002).

Além disso, os planejamentos estatísticos permitem aos pesquisadores verificarem as relações entre variáveis propostas e a resposta, que é o produto de interesse (BOX; HUNTER; HUNTER, 1976).

A metodologia de superfície de resposta é aplicada para otimização dos componentes do meio de cultivo e outras variáveis críticas responsáveis pela produção de biomoléculas (YA-HONG et al., 2004). Sharma, Bardhan e Patel (2009) empregaram essa metodologia na otimização dos fatores físicos influentes na produção de lipase. Os autores concluíram que a estatística é uma ferramenta útil e poderosa para a identificação dos parâmetros da produção e desenvolvimento das condições ótimas de cultivo. Através do emprego da metodologia de superfície de resposta é possível o desenvolvimento de um modelo polinomial para a otimização do meio de cultivo para a produção de lipase (HE; TAN, 2006).

Rajendran e Thangavelu (2009) avaliaram a influência dos componentes do meio de fermentação na produção de lipase por *R. arrhizus*. Os autores empregaram um planejamento fatorial denominado de Plackett–Burman, com 12 variáveis em 2 níveis, resultando em 16 ensaios. De acordo com os autores, esse tipo de planejamento fatorial é uma ferramenta útil para a identificação de fatores significativos, a partir de um grande número de variáveis independentes. Após análise estatística dos resultados, as seguintes variáveis foram consideradas significativas na produção de lipase: óleo de oliva, peptona,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os autores concluíram que o planejamento estatístico de

experimentos é uma metodologia eficiente para a identificação das variáveis significativas e para otimização dos fatores influentes na produção de lipase.

Salihu et al. (2011a) empregaram um planejamento fatorial  $2^3$  para determinar os efeitos da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), agitação (rpm) e aeração (vvm), sobre a produção de lipase por *C. cylindracea*. Foram realizados 10 ensaios com dois pontos centrais. Após análise estatística dos resultados, os três fatores testados foram significativos ( $p < 0,05$ ), sendo que a melhor condição determinada para produção de lipase foi a  $30^{\circ}\text{C}$ , 1,0 vvm e 400 rpm.

Sánchez-Otero et al. (2011) estudaram a produção de lipase por *G. thermoleovorans* utilizando planejamentos fatoriais. Primeiramente, foi utilizado um planejamento fracionado visando à seleção das variáveis significativas (temperatura, pH, agitação, volume de inóculo, óleo de cártamo, goma arábica e solução de nutrientes) na produção de lipase. A temperatura e a concentração da solução de nutrientes apresentaram efeito significativo, sendo aplicado um segundo planejamento para determinar o ótimo dessas variáveis. Os resultados demonstraram aumento de 6 a 7 vezes na produção de lipase antes da otimização.

Abdel-Fattah et al. (2012) realizaram a seleção dos fatores significativos na produção de lipase por *G. thermodenitrificans*, com o emprego de dois planejamentos fatoriais. Primeiramente, foi utilizado um modelo Plackett-Burman com 10 variáveis (sacarose, amido, farinha de soja, peptona,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ , pH e temperatura). Os resultados demonstraram que a peptona, farinha de soja e a sacarose foram as variáveis que mais influenciaram significativamente a produção de lipase. Posteriormente, foi empregado um modelo Box-Behnken para determinar as concentrações ótimas dessas variáveis e a máxima produção foi de 592,59 U/mL, sendo obtida em 6,56 g/L de sacarose, 6,36 g/L de peptona e 6,92 g/L de farinha de soja.

Os delineamentos de misturas têm sido empregados amplamente no processamento de alimentos, nas indústrias farmacêutica, química, agrícola e de cosméticos (ZHANG; WONG, 2013). Um experimento de mistura é um tipo especial de delineamento experimental, em que os fatores são as proporções dos componentes em uma mistura e os seus níveis não são independentes uns dos outros (FLORES et al., 2010). Nesse tipo de delineamento as proporções não podem ser negativas e se expressadas como frações de misturas, elas devem somar uma unidade (CORNELL, J. A., 1990).

Borsato et al. (2010) otimizaram as condições de obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja utilizando um delineamento experimental de misturas, simplex-centróide com 3 componentes (NaOH, KOH e NaMet). O melhor rendimento na produção de biodiesel foi obtido utilizando-se como catalisador uma mistura de NaOH e NaMet. Os autores relataram que o delineamento de mistura mostrou ser uma boa ferramenta para avaliar a eficiência de catalisadores ou a mistura destes na reação de transesterificação do óleo de soja.

Flores et al. (2010) aplicaram essa metodologia para estudar o efeito da goma xantana e do sorbato de potássio nas propriedades de filmes de amido de tapioca, obtidos por extrusão. Os resultados mostraram que a presença de sorbato de potássio diminuiu a resistência e a elasticidade, e a goma xantana aumentou a resistência, a solubilidade em água e diminuiu o teor de umidade dos filmes. Os autores descreveram que o delineamento experimental de misturas foi eficaz na obtenção de modelos matemáticos para prever valores da resposta e foi uma ferramenta útil para entender melhor a influência de diferentes variáveis sobre as propriedades de filmes.

Giese et al. (2011) utilizaram essa metodologia estatística para otimizar a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase por *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum*. Foi empregado um delineamento com 10 ensaios e 3 componentes, glicose, lactose e botriosferana (exopolissacarídeo), para identificação da melhor mistura das fontes de carbono testadas. Para *B. rhodina* a glicose e a lactose estimularam a produção da enzima, enquanto a botriosferana apresentou um efeito favorável quando usada em conjunto com um dos outros substratos na produção de  $\beta$ -1,3-glucanase por *T. harzianum*.

Delabona et al. (2012) investigaram a influência do bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e sacarose na produção de glicosil hidrolases por *Trichoderma harzianum*. Um delineamento experimental de misturas com 10 ensaios foi empregado e os resultados indicaram que a mistura dos componentes pode maximizar significativamente a taxa de biossíntese das enzimas, especialmente das xilanases, que aumentaram em 2 vezes. Segundo os autores, essa metodologia é interessante, pois pode ser moldada para estudar a proporção dos componentes de um determinado meio de cultivo e pode auxiliar na identificação das relações entre estes componentes durante a produção da enzima.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Microrganismo

*Trichoderma koningii* foi isolado do solo da floresta amazônica e cedido pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

#### 4.1.2 Meios de Cultura

##### 4.1.2.1 Meio de preservação e meio de inóculo

O meio de preservação e de inóculo foi ágar batata e dextrose (BDA) a 39,0 g/L.

##### 4.1.2.2 Meio de fermentação

Como meio de fermentação foi utilizado o meio de Vogel (Tabela 4) diluído em água destilada 1:50 (v/v), para todos os cultivos.

**Tabela 4** – Meio de Vogel (VOGEL, 1956).

<b>Componentes</b>	<b>Quantidades/L</b>
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O (Citrato de sódio)	150 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5 g
Solução de Biotina (5mg biotina/ 50mL de H <sub>2</sub> O)	2,5 mL
Solução de Elementos Traços (Tabela 5)	5 mL
Água Destilada	*q.s.p

\*Quantidade suficiente para completar o volume final

**Tabela 5** – Componentes da solução de elementos traços.

<b>Componentes</b>	<b>g/100 mL</b>
Ácido cítrico	5 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	5 g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12 H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,25 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05 g
H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub> (anidro)	0,05 g
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,05 g
Água Destilada	*q.s.p

\*Quantidade suficiente para completar o volume final

#### 4.1.3 Efluente de Lactícnio

O efluente lipídico foi cedido por uma indústria de produção de leite localizada na região de Londrina, Paraná. A amostra do efluente foi coletada no tanque de homogeneização e apresentou as seguintes características: pH 9,0; 1.376,00 mg/L de DQO; 70 mg/L de lipídios totais; 189,49 mg/L de proteínas totais e 55,83 mg/L de açúcares totais.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Preservação do Microrganismo

O microrganismo foi crescido em BDA (4.1.2.1), a 28 °C por 96 horas e armazenado a 4 °C. O repique das células foi realizado a cada 15 dias.

### 4.2.2 Inóculo

O inóculo foi obtido em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de BDA (4.1.2.1), incubados a 28° C por 96 horas. Após esse tempo foi

adicionada solução salina 0,9 % (p/v) até obtenção do inóculo de  $10^6$  esporos/mL. O volume de inóculo foi fixado em 1 % (v/v).

#### 4.2.3 Avaliação das Condições de Fermentação para Produção de Lipase

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) com 25 mL do meio de Vogel (4.1.2.2), pH 6,0 e com 5 mL/L de Tween 80. Os cultivos foram incubados em shaker orbital a 28 °C, 120 rpm por 120 horas.

O processo fermentativo foi interrompido por filtração à vácuo em papel filtro Whatman (n° 1). A biomassa foi determinada por gravimetria e o sobrenadante foi denominado como extrato enzimático, sendo utilizado como fonte de lipase.

##### 4.2.3.1 Efeito de óleos vegetais na produção de lipase

Para verificar o efeito de óleos vegetais na produção de lipase foram testados os óleos de oliva, soja, canola, milho e girassol a 10 mL/L. A produção de lipase foi determinada pelo método do *p*-NPP (4.2.6.2), aplicando o teste Tukey com 5 % de significância.

##### 4.2.3.2 Efeito do tempo de fermentação na produção de lipase

Para avaliar o melhor tempo na produção de lipase, os cultivos foram realizados até 168 horas, em duas concentrações de óleo de oliva (10 e 30 mL/L). A cada 24 horas foram determinadas a concentração de biomassa e a atividade lipase.

##### 4.2.3.3 Efeito do extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4$ na produção de lipase

Para otimização da produção de lipase em diferentes nutrientes, primeiramente foi realizado um planejamento fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$ , com 12 ensaios e 4 repetições no ponto central, com as variáveis independentes (g/L): extrato de levedura (0; 15 e 30),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,5; 2,5 e 4,5) e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,5; 2,0 e 3,5). A concentração de óleo de oliva foi fixada em 10 mL/L. As respostas foram:  $Y_1$  atividade de lipase e  $Y_2$  concentração de biomassa (Tabela 6).

**Tabela 6** – Planejamento fatorial fracionado  $3^{(3-1)}$  para avaliação da influência da concentração (g/L) de extrato de levedura,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  na produção de lipase por *T. koningii*, em meio de Vogel suplementado com 10 mL/L de óleo de oliva, a 28 °C, 120 rpm por 120 horas.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Extrato de Levedura (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L)
1	-1	-1	-1	0	0,5	0,5
2	-1	0	+1	0	2,5	3,5
3	-1	+1	0	0	4,5	2,0
4	0	-1	+1	15	0,5	3,5
5	0	+1	-1	15	4,5	0,5
6	+1	-1	0	30	0,5	2,0
7	+1	0	-1	30	2,5	0,5
8	+1	+1	+1	30	4,5	3,5
9	0	0	0	15	2,5	2,0
10	0	0	0	15	2,5	2,0
11	0	0	0	15	2,5	2,0
12	0	0	0	15	2,5	2,0

#### 4.2.3.4 Efeito da temperatura, pH e agitação na produção de lipase

Para avaliar a influência da temperatura, pH e agitação na produção de lipase foi desenvolvido um segundo planejamento fatorial do tipo Box Behnken  $3^3$  incompleto, com 15 ensaios e 3 repetições no ponto central, com as variáveis independentes: temperatura ( 21; 28 e 35 °C), pH (4,0; 6,0 e 8,0) e agitação (90; 120 e 150 rpm). A concentração de óleo de oliva foi fixada em 10 mL/L. As respostas foram: Y<sub>1</sub> atividade de lipase e Y<sub>2</sub> concentração de biomassa (Tabela 7).

**Tabela 7** – Planejamento fatorial Box Behnken 3<sup>3</sup> incompleto para avaliação do efeito da temperatura (°C), pH e agitação (rpm) na produção de lipase por *T. koningii*, em meio de Vogel suplementado com 10 mL/L de óleo de oliva por 120 horas.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Temperatura (°C)	pH	Agitação (rpm)
1	-	-	0	21	4	120
2	+	-	0	35	4	120
3	-	+	0	21	8	120
4	+	+	0	35	8	120
5	-	0	-	21	6	90
6	+	0	-	35	6	90
7	-	0	+	21	6	150
8	+	0	+	35	6	150
9	0	-	-	28	4	90
10	0	+	-	28	8	90
11	0	-	+	28	4	150
12	0	+	+	28	8	150
13	0	0	0	28	6	120
14	0	0	0	28	6	120
15	0	0	0	28	6	120

#### 4.2.4 Fermentação para produção de lipase em efluente de laticínio

Para verificar a produção de lipase no efluente de laticínio foram realizadas duas fermentações, a primeira sem suplementação nas condições pré-definidas nos planejamentos fatoriais: pH 6,0; 28 °C, 105 rpm e 120 horas. Na segunda foi empregado um delineamento experimental de misturas, simplex-centróide, com 4 componentes, totalizando 17 ensaios. Os componentes foram: (X<sub>1</sub>) óleo de oliva, (X<sub>2</sub>) Tween 80, (X<sub>3</sub>) glicerol e (X<sub>4</sub>) meio de Vogel (Tabela 8). Nesse tipo de delineamento os componentes são adicionados em proporções, sendo que a soma deve ser igual a 1.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125 mL) com os volumes dos componentes descritos na Tabela 8 e completados até 25 mL com o efluente. A resposta (Y<sub>1</sub>) atividade de lipase foi determinada de todos os ensaios.

Os cultivos foram interrompidos por filtração à vácuo em papel filtro Whatman (n° 1). A biomassa foi determinada por gravimetria e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzima.

**Tabela 8** – Delineamento experimental de misturas para avaliação dos componentes, óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel na produção de lipase por *T. koningii* em efluente de laticínio, pH 6,0; 28 °C, 105 rpm e 120 horas.

Ensaio	Componentes			
	Óleo de Oliva (mL/L)	Tween 80 (mL/L)	Glicerol (mL/L)	Meio de Vogel (mL/L)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>
1	20 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2	0 (0)	15 (1)	0 (0)	0 (0)
3	0 (0)	0 (0)	10 (1)	0 (0)
4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	40 (1)
5	10 (0,5)	7,5 (0,5)	0 (0)	0 (0)
6	10 (0,5)	0 (0)	5 (0,5)	0 (0)
7	10 (0,5)	0 (0)	0 (0)	20 (0,5)
8	0 (0)	7,5 (0,5)	5 (0,5)	0 (0)
9	0 (0)	7,5 (0,5)	0 (0)	20 (0,5)
10	0 (0)	0 (0)	5 (0,5)	20 (0,5)
11	6,6 (0,33)	4,99 (0,33)	3,3 (0,33)	0 (0)
12	6,6 (0,33)	4,99 (0,33)	0 (0)	13,2 (0,33)
13	6,6 (0,33)	0 (0)	3,3 (0,33)	13,2 (0,33)
14	0 (0)	4,99 (0,33)	3,3 (0,33)	13,2 (0,33)
15	5 (0,25)	3,75 (0,25)	2,5 (0,25)	10 (0,25)
16	5 (0,25)	3,75 (0,25)	2,5 (0,25)	10 (0,25)
17	5 (0,25)	3,75 (0,25)	2,5 (0,25)	10 (0,25)

\*Os volumes dos componentes foram adicionados de acordo com as proporções e completados até 25 mL com o efluente

#### 4.2.5 Caracterização Bioquímica do Extrato Bruto Enzimático

O extrato enzimático produzido nas condições otimizadas pelos planejamentos fatoriais foi caracterizado bioquimicamente, quanto ao efeito da temperatura, pH, íons metálicos, solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase. A atividade foi determinada pelo método do *p*-NPP.

##### 4.2.5.1 Efeito da temperatura na atividade de lipase

O efeito da temperatura na atividade de lipase foi investigado utilizando o *p*-NPP como substrato e a atividade foi determinada pela incubação da enzima em várias temperaturas (25 a 75 °C), no tampão 50 mM Tris-HCl (pH 8,5) por 10 minutos. A termoestabilidade foi verificada incubando o extrato enzimático na

faixa de 25 a 75 °C por 2 horas. Após a incubação, a atividade de lipase foi determinada pelo método do *p*-NPP.

#### 4.2.5.2 Efeito do pH na atividade de lipase

O pH ótimo na atividade de lipase foi verificado utilizando o *p*-NPP como substrato, a 37 °C por 10 minutos e a faixa estudada de pH foi de 6,0 a 9,0 , nos tampões (50 mM): citrato-fosfato (pH 6,0 a 6,5) e Tris- HCl (pH 7,0 a 9,0). A estabilidade em diferentes valores de pH foi verificada pela incubação da enzima, a 30 °C por 2 horas, em diferentes tampões (50mM): citrato-fostato (pH 3,0 a 6,5) e Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0). Após a incubação, a atividade de lipase foi determinada pelo método do *p*-NPP , a 37 °C e pH 8,0.

#### 4.2.5.3 Efeito de íons metálicos na atividade de lipase

O efeito de íons metálicos na atividade de lipase foi avaliado incubando o extrato bruto enzimático em NaCl, CaCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub> e KCl (100 mM), na proporção de 1:1 (v/v), a 30 °C por 2 horas. A atividade residual da enzima foi determinada pelo método do *p*-NPP, a 37 °C, pH 8,0 e comparada com a atividade do controle (amostra da enzima com água destilada).

#### 4.2.5.4 Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase

O efeito dos solventes orgânicos, isopropanol, etanol, glicerol, acetonitrila, acetona, hexano, n-dodecano, querosene (99.5 % v/v), e detergentes Tween 80 e Triton X-100 (10 % v/v) na atividade de lipase foi avaliado. A enzima foi incubada nos diferentes compostos na proporção de 1:1 (v/v), a 30 °C por 2 horas. A atividade enzimática residual foi determinada pelo método do *p*-NPP, a 37 °C, pH 8,0 e comparada com a atividade do controle (amostra da enzima com água destilada).

## 4.2.6 Métodos Analíticos

### 4.2.6.1 Determinação da biomassa

A biomassa foi quantificada por gravimetria. Após a interrupção dos cultivos, os papéis filtro Whatman (n°1) foram secos em estufa a 80 °C, até peso constante.

### 4.2.6.2 Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada utilizando o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato, baseado no método de Winkler e Stuckmann (1979). O extrato bruto enzimático foi incubado com o *p*-NPP (8,0 mM solubilizado em isopropanol), tampão Tris-HCl 50mM (pH 8,5) contendo Triton X-100 (0,4% p/v), a 37 °C por 10 minutos. A liberação *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi medida a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol/min de *p*-nitrofenol (*p*-NP), nas condições do ensaio.

### 4.2.6.3 Caracterização do efluente

#### 4.2.6.3.1 Determinação dos lipídios totais

Os lipídios totais do efluente foram determinados pelo método de Frings e Dunn (1970). Como padrão foi utilizado o ácido oléico (1 mg/100 mL de etanol absoluto). Foi adicionado 1 mL do efluente em um tubo de ensaio e incubado em banho fervente até ocorrer a evaporação completa. Nesse tubo foi adicionado 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e incubado em banho fervente por 10 minutos. Após o resfriamento, foi transferida uma alíquota de 1 mL da solução para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 5,0 mL de fosfovanilina. Os tubos foram incubados por 15 minutos a 37 °C e resfriados em temperatura ambiente, sendo medidas as absorvâncias a 540 nm.

#### *4.2.6.3.2 Determinação das proteínas*

A concentração de proteínas do efluente foi quantificada segundo o método de Hartree (1972), utilizando como padrão a solução de soro albumina bovina (200 µg/mL). As absorvâncias foram medidas a 650 nm.

#### *4.2.6.3.3 Determinação dos açúcares totais*

Os açúcares totais do efluente foram quantificados de acordo o método de Dubois et al. (1956), utilizando um padrão de glicose (100 µg/mL). As absorvâncias foram medidas a 490 nm.

#### *4.2.7 Análise Estatística*

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Statistica 9.0 (Statsoft Inc., USA, 2009), para análise de variância (ANOVA) com 5% de significância e análise múltipla de regressão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados:

- 5.1- Artigo 1: “Optimization of lipase production by *Trichoderma koningii* isolated from Amazon rainforest”, submetido de acordo com as normas do periódico Brazilian Journal of Microbiology (Anexo A).
- 5.2- Artigo 2: “Produção de lipase em efluente de laticínio por um novo isolado de *Trichoderma koningii*” submetido de acordo com as normas do periódico “Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic B” (Anexo B).
- 5.3- Resultados complementares.

## 5.1 ARTIGO 1

**OPTIMIZATION OF LIPASE PRODUCTION BY *TRICHODERMA KONINGII*  
ISOLATED FROM AMAZON RAINFOREST**

Thiago Andrade Marques<sup>1</sup>, Dionísio Borsato<sup>2</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone  
Celligoi<sup>1\*</sup>

**ABSTRACT:** Lipase production by *Trichoderma koningii*, isolated from soil of the Amazon rainforest, was evaluated and optimized via the statistical design method. The effect of different vegetable oils (olive, canola, soybean, corn and sunflower) and fermentation time (24-168 hours) was investigated. Olive oil was the best substrate for lipase production (172.85 U/ml), followed by canola (145.37 U/ml), soybean (128.70 U/ml), corn (125.59 U/ml) and sunflower (112.85 U/ml) oils. The highest enzymatic activities occurred in the late logarithmic phase (120 hours). Two experimental designs were applied to evaluate the components in the culture medium and the physical parameters. Different concentrations of yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O did not stimulate lipase production. The optimization of the temperature levels, pH and agitation resulted in the maximum enzyme production (175.20 U/ml), obtained at 28 °C, pH 6.0 and 105 rpm. A high coefficient of determination (R<sup>2</sup> = 0.96) and no significant lack of fit were observed, indicating that the proposed model can be used for predictive purposes. The statistical methodology proved to be an efficient technique for identifying critical variables on lipase production. The new isolated of *T. koningii* demonstrated to be a promising producer of lipase with potential application in various sectors of biotechnology.

**Key words:** Lipase. *Trichoderma koningii*. Fermentation. Optimization and response surface methodology.

**INTRODUCTION**

Lipases catalyze a variety of reactions, such as total or partial hydrolysis of triacylglycerols, esterification reactions, transesterification, and interesterification. Due to these reactions, lipases are applied in several industrial sectors (5, 38), such as in wastewater treatments (3), ester synthesis (27), addition to detergents (26), synthesis of food additives (41) and in biodiesel production (44).

---

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Post-Box 10.011-Londrina, Parana State, Brazil

<sup>1\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55 43 3371-4270 - E-mail: macelligoi@uel.br

In general, microbial lipases are extracellular and are excreted through the membrane into the culture medium (22). They are more attractive than those of animal or vegetable origin because they offer a great variety of catalytic activity, higher yields, ease of genetic manipulation and no seasonal fluctuation (10). The most reported lipase-producing fungal genera are *Candida* (29), *Rhizopus* (23), *Aspergillus* (27), *Penicillium* (16) and *Geotrichum* (22). In this study, a species of *Trichoderma* was used, which has been reported as a producer of multiple enzymes, including cellulase (8), xylanase (45), laccase (2) and  $\beta$ -glucosidase (18). However, research on lipase production by this genus has been little explored.

Nutritional and physical factors are important for high lipase production, because they alter the yield, inducing or repressing it. The development of an economic medium of production requires a selection of carbon and nitrogen sources that enable growth of the microorganism and maximize product yield (11). Hasan-Beikdashti *et al.* (12) carried out a selection of nutritional components that influence lipase production by *Stenotrophomonas maltophilia*. Olive oil, yeast extract, peptone and  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  showed significant effects, and after optimization of these factors, an increase in enzyme production of 9.1 fold was achieved.

Lipase biosynthesis is influenced by several physical parameters, among which, agitation is considered a critical factor in enzyme production. Increasing the agitation speed will improve the oxygen transfer rate and the mixture of the culture medium, thus allowing an increase in cellular growth and lipase production. However, very high levels of agitation cause higher shear force, which can lead to negative effects in cellular growth and enzymatic activity (19). The incubation temperature of the culture medium is also one of the critical factors in lipase production. However, this parameter varies among microorganisms (24). Lipase production by *Kluyveromyces marxianus* increased 18 fold with the optimization of the temperature and pH levels in the culture medium (34).

The response surface methodology (RSM) is a powerful technique for testing multiple variables because fewer experimental tests are needed, and it allows an assessment of the relation between a set of factors and the results observed (21, 43). This tool has been applied to the optimization of critical variables in the production of various biomolecules (4, 7). In several studies on lipase production, RSM was successfully employed for the optimization of nutritional and physical conditions (12, 15, 29). RSM allowed a selection of important factors and

development of a polynomial model for the optimization of the culture medium in lipase production by *Candida* sp. (13). Sánchez-Otero *et al.* (30) described an increase in lipase production by *Geobacillus thermoleovorans* of 6.17 fold, using RSM.

Research that aims to use different microorganisms, supplements and substrates can contribute to obtaining lipase with high value and lower production costs at an industrial scale (25). The Optimization of fermentation conditions, especially physical and chemical parameters are of primary importance in developing a fermentation process, due to its impact on the economy and the practicality of the process (1). In this context, this research is the first report on the optimization of lipase production from *Trichoderma koningii*, isolated from soil of the Amazon rainforest. The new isolate proved to be a promising producer of a lipase with potential application in various sectors of biotechnology.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Microorganism and inoculum preparation**

*T. koningii* was isolated from soil of the Amazon rainforest and identified by the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). The strain was grown in a potato dextrose agar medium (PDA), in Erlenmeyer flasks (125 ml), at 28 °C for 4 days and subcultured every 15 days. It was maintained and preserved at 4 °C. The inoculum was fixed at  $10^6$  spores/ml.

### **Medium and fermentation conditions**

Lipase production medium was Vogel minimal salts medium (39) supplemented with Tween 80 (5 ml/l). The initial pH was 6.0 and sterilization occurred at 121 °C for 15 minutes. One percent (1 % v/v) of the inoculum prepared was added to each 25 ml of medium in Erlenmeyer flasks (125 ml). The cultures were incubated in orbital shakers at 120 rpm and 28 °C for 5 days. After fermentation, the cultures were filtered. The supernatant was used to determinate lipase activity and the biomass was quantified gravimetrically.

### **Effect of different vegetable oils and fermentation time on lipase production**

Lipase production was evaluated by testing different vegetable oils (olive, soybean, canola, corn and sunflower) at 10 ml/l. The enzymatic activity was compared using the Tukey test with 5% significance. The effect of fermentation time on the lipase production was evaluated every 24 hours for 168 hours in Vogel minimal salts medium, supplemented with 10 and 30 ml/l of olive oil. Biomass concentration and lipase activity were determined.

### **Optimization of fermentation conditions for lipase production**

To evaluate the components in the culture medium and the physical parameters that were important for lipase production, two experimental designs were employed. In both cases, the concentration of olive oil was fixed at 10 ml/l. In the first one, a  $3^{(3-1)}$  fractional factorial design was used with 3 variables at 3 levels in 12 experiments, including 4 center points. The independent variables were (g/l): yeast extract (0; 15 and 30),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0.5; 2.5 and 4.5) and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.5; 2.0 and 3.5). The lipase activity was taken as the response of the design (U/ml) (Table 1).

The second factorial design used was a Box-Benhenken design with 15 experiments, including 3 center points, with 3 variables at 3 levels. The independent variables were: temperature (21; 28 and 35 °C), pH (4.0; 6.0 and 8.0) and agitation (90; 120 and 150 rpm). The lipase activity was taken as the response of the design (U/ml) (Table 2).

Both factorial designs were based on the quadratic model (Eq.1):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Eq.1})$$

where Y is the response variable (lipase activity),  $\beta_0$  is the intercept,  $\beta_i$  is the coefficient for the linear effect,  $\beta_{ii}$  is the coefficient for the quadratic effect,  $\beta_{ij}$  is the coefficient for the interaction effect and x is the coded level of the variable.

The factors and levels of the variables were chosen based on a preliminary review of literature and results from previous experiments (data not published), aiming to select important parameters for lipase production.

An analysis of variance (ANOVA) with 5% significance and multiple regression analysis was performed on the data using the program Statistica 9.0 (33).

### **Determination of lipase activity**

The lipase activity was determined using *p*-nitrophenyl-palmitate (*p*NP-P) as substrate, based on the method of Winkler e Stuckmann (42). The supernatant was incubated with *p*NP-P (8.0 mM dissolved in isopropanol), 50mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) containing Triton X-100 (0.4 % w/v), at 37 °C for 10minutes. The release of *p*-nitrophenol (*p*-NP) was measured at 410nm. One unit of enzyme activity (U/ml) was defined as the amount of enzyme required to release 1 $\mu$ mol/min de *p*- nitrophenol (*p*-NP).

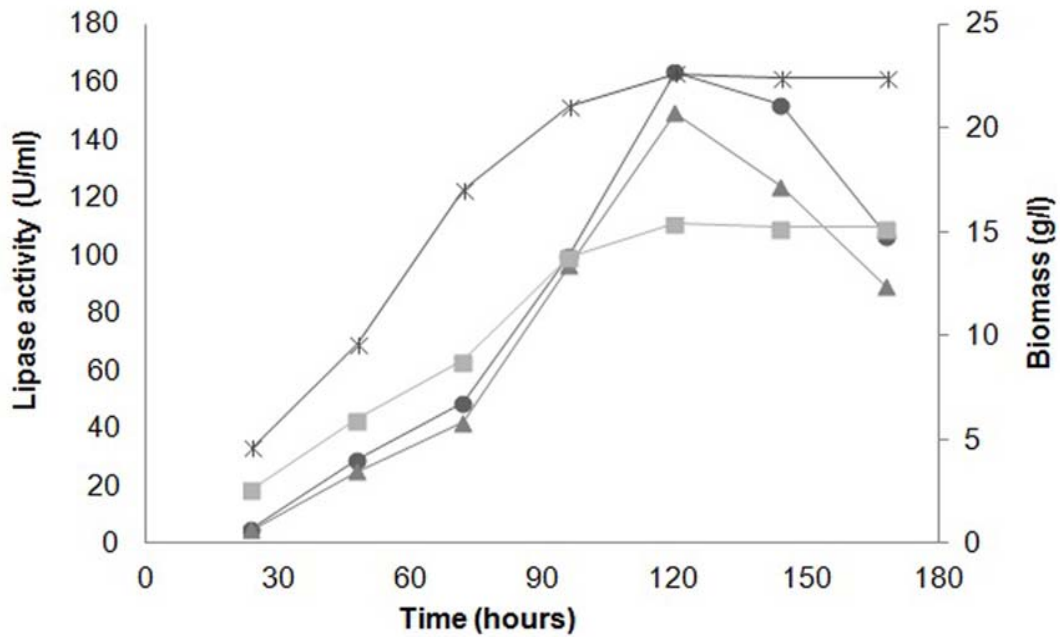
## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Effect of different vegetable oils and fermentation time on lipase production**

Olive oil was the best substrate for lipase production (172.85 U/ml), followed by canola (145.37 U/ml), soybean (128.70 U/ml), corn (125.59 U/ml) and sunflower (112.85 U/ml) oils. Lipase production by *Burkholderia multivorans* was studied in different oils, and the highest activity occurred in olive oil (6). Higher lipase production in cultures with olive oil appeared to be correlated with higher content of oleic acid, while canola, sunflower, corn and soybean oils have higher percentages of linoleic acid (17, 40). Maldonado *et al.* (22) evaluated the effect of the same oils tested in our study, and, unlike the results presented here, no significant difference on lipase production by *G. candidum* was observed.

The effect of fermentation time was investigated, and it was observed that lipase production followed cellular growth (Figure 1). The highest enzymatic activities were 163.44 U/ml (10 ml/l of olive oil) and 149.9 U/ml (30 ml/l de olive oil) and occurred in the late logarithmic phase (120 hours). From 120 hours on, a significant decline in enzymatic activity was observed. Dheeman *et al.* (9) also observed a drastic decrease in lipase activity from *Penicillium* sp. after 120 hours and attributed this decrease to protease production in the medium after the stationary phase. With an increase in concentration of the oil, a decrease in enzyme production occurred, which may have been caused by the poorer oxygen transfer in the culture medium (17). Liu *et al.* (20) also obtained higher lipase production by *Burkholderia* sp. with 10 ml/l of olive oil, and the authors described the decrease in enzyme production in concentrations higher than 10 ml/l.

**Figure 1** - Effect of fermentation time on lipase production by *T. koningii* at 28 °C, 120 rpm and pH 6.0. Lipase activity (●) and biomass concentration (■) with 10 ml/l olive oil. Lipase activity (▲) and biomass concentration (\*) with 30 ml/l olive oil.



### Optimization of fermentation conditions for lipase production

The results of lipase production by *T. koningii* are shown in Table 1. The lipase activity ranged from 1.92 to 108.70 U/ml, and the highest activity (101.75 U/ml, average of center points) occurred at 15 g/l of yeast extract; 2.5 g/l of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 2.0 g/l of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . The lowest production was observed in run 3 (with no yeast extract; 4.5 g/l of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 2.0 g/l of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

**Table 1 -** Fractional factorial design to investigate the effect of yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  on lipase production by *T. koningii*, showing the real and coded values along with the experimental responses.

Runs	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$	$Y_2$
	Yeast extract (g/l)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l)	Lipase activity (U/ml)	Biomass (g/l)
1	0 (-1)	0.5 (-1)	0.5 (-1)	2.56	12.00
2	0 (-1)	2.5 (0)	3.5 (+1)	4.24	24.40
3	0 (-1)	4.5 (+1)	2.0 (0)	1.92	19.20
4	15 (0)	0.5 (-1)	3.5 (+1)	73.70	10.40
5	15 (0)	4.5 (+1)	0.5 (-1)	69.26	32.40
6	30 (+1)	0.5 (-1)	2.0 (0)	54.67	18.80
7	30 (+1)	2.5 (0)	0.5 (-1)	41.41	11.20
8	30 (+1)	4.5 (+1)	3.5 (+1)	51.33	32.40
9	15 (0)	2.5 (0)	2.0 (0)	97.48	27.60
10	15 (0)	2.5 (0)	2.0 (0)	99.70	26.00
11	15 (0)	2.5 (0)	2.0 (0)	108.70	16.40
12	15 (0)	2.5 (0)	2.0 (0)	101.11	17.60

Yeast extract and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  stimulated lipase production, while  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  showed a negative effect. Only the variable  $X_1$  ( $p= 0.0014$ ) and the interaction between  $X_1$  and  $X_2$  ( $p= 0.0394$ ) significantly influenced enzyme synthesis (Table 2). Sifour *et al.* (32) also reported the not significant effect of  $\text{MgSO}_4$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on lipase production by *G. stearothermophilus*. Hasan-Beikdashti *et al.* (12) verified the positive effect of yeast extract on lipase production from *Stenotrophomonas maltophilia*. According to authors, yeast extract is a nitrogen source and a supplier of vitamins. Ramani *et al.* (24) also described the positive effect of yeast extract and the inhibiting effect of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on lipase synthesis by *Pseudomonas gessardii*. In contrary,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was reported as a stimulant on lipase production (20, 35, 36).

**Table 2** - Regression analysis of the effects of variables on lipase production from the first factorial design.

Factor	Coefficient	Error	t-value	p-value
Intercept	101.75	2.40	42.47	0.000002*
Yeast extract (X <sub>1</sub> ) (L)	23.11	1.96	11.82	0.0014*
Yeast extract (X <sub>1</sub> ) (Q)	-55.55	3.09	-17.96	0.0004*
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (X <sub>2</sub> ) (L)	-1.40	1.96	-0.72	0.5311
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (X <sub>2</sub> ) (Q)	-6.89	3.09	-2.23	0.1160
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (X <sub>3</sub> ) (L)	2.67	1.96	1.37	0.2714
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (X <sub>3</sub> ) (Q)	-23.38	3.91	-5.97	0.0098*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	11.01	3.09	3.56	0.0394*

Lack of fit: p=0.42; R<sup>2</sup>=0.99; \*Significance at p<0.05.

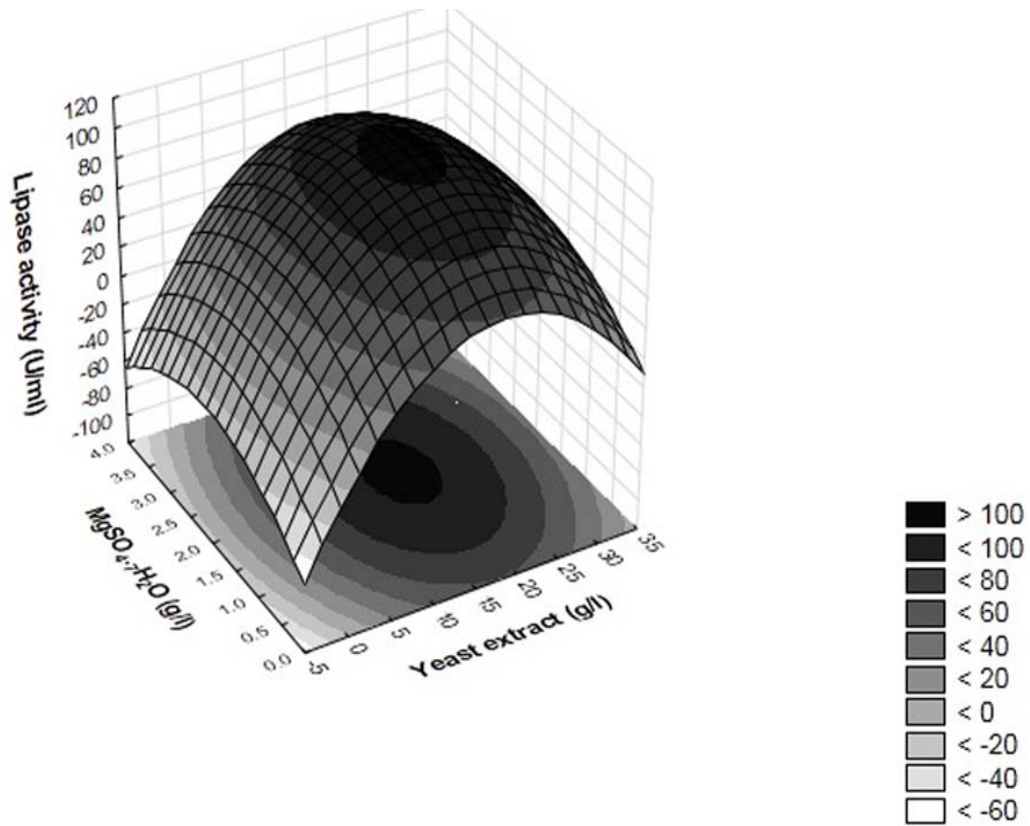
Using the results of the first factorial design, the following second order polynomial equation (Eq. 2) was obtained:

$$Y_1 = 101.75 + 23.11 x_1 - 1.40 x_2 + 2.67 x_3 + 11.01 x_1 x_2 - 55.55 x_1^2 - 6.89 x_2^2 - 23.38 x_3^2 \quad (\text{Eq. 2})$$

where Y<sub>1</sub> is the lipase activity response, x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> and x<sub>3</sub> are the codified variables, yeast extract, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, respectively. The high coefficient of determination obtained (R<sup>2</sup> = 0.99) and no significant lack of fit (p= 0.42) indicate that the proposed model describes the experimental data well and can be used for predictive purposes.

The response surface (Figure 2) shows that the maximum lipase production is situated in the center point of yeast extract and MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

**Figure 2 -** Response surface for independent variables yeast extract and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  concentrations (g/l) for the lipase production by *T. koningii*. The  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration was fixed at 2.5 g/l.



The highest experimental production was 101.75 U/ml, occurring at 15 g/l of yeast extract; 2.5 g/l of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 2.0 g/l of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , and the predictive model indicated 101.75 U/ml as the maximum theoretical production, also at the conditions of the center points. Therefore, it was not necessary to carry out additional experiments to confirm the model.

The factors studied (yeast extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) did not stimulate lipase production by *T. koningii*, in the absence of these nutrients has been observed higher values of lipase production in the study of effect of different vegetable oils (172.85; 145.37; 128.70; 125.59; 112.85 U/ml, in olive, canola, soybean, corn and sunflower oils, respectively). Therefore, in the second design was investigated the influence of the physical variables (temperature, pH and agitation) on lipase production, adding olive oil but without the nutrients from the first design.

The results from the second factorial design are presented in Table 3, which shows high variation in lipase activity from 0 to 169.78 U/ml. The highest activity (163.01 U/ml, average of center points) occurred at 28 °C; pH 6.0 and 120 rpm.

**Table 3** - Box Behnken design to investigate the effect of temperature (°C), pH and agitation (rpm) on lipase production by *T. koningii*, showing the real and coded values along with the experimental responses.

Runs	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
	Temperature (°C)	pH	Agitation (rpm)	Lipase activity (U/ml)	Biomass (g/l)
1	21 (-1)	4 (-1)	120 (0)	50.37	7.20
2	35 (+1)	4 (-1)	120 (0)	0	0
3	21 (-1)	8 (+1)	120 (0)	23.70	5.60
4	35 (+1)	8 (+1)	120 (0)	0	0
5	21 (-1)	6 (0)	90 (-1)	121.42	9.60
6	35 (+1)	6 (0)	90 (-1)	25.89	10.00
7	21 (-1)	6 (0)	150 (+1)	39.64	8.80
8	35 (+1)	6 (0)	150 (+1)	16.93	7.20
9	28 (0)	4 (-1)	90 (-1)	131.19	13.60
10	28 (0)	8 (+1)	90 (-1)	48.96	8.00
11	28 (0)	4 (-1)	150 (+1)	74.44	7.20
12	28 (0)	8 (+1)	150 (+1)	4.90	3.20
13	28 (0)	6 (0)	120 (0)	156.22	18.40
14	28 (0)	6 (0)	120 (0)	163.04	19.20
15	28 (0)	6 (0)	120 (0)	169.78	18.80

Statistical analysis showed that the variables temperature, pH and agitation had a significant effect, as well as the interaction between X<sub>1</sub> and X<sub>3</sub>. Temperature was the variable with highest influence on the process (p= 0.0098) and presented a negative effect on the enzyme production (Table 4). According to Table 3, when comparing runs 1 and 2, which had same pH and agitation, the increase in temperature from 21 °C to 35 °C caused an absence in enzyme production. Abdel-Fattah *et al.* (1) described the positive effect that temperature on lipase production by *G. thermodenitrificans*. Temperature is one of the critical parameters on lipase production and varies according to the microorganism studied (24). The optimal temperature for lipase production by *Bacillus pumilus* was 40 °C (15); for *C. cylindracea*, 25 °C (29); and for *Arthrobacter sp.*, 50 °C (31), showing significant influence on enzyme synthesis.

**Table 4** - Regression analysis of the effects of variables on lipase production from the second factorial design.

Factor	Coefficient	Error	t-value	p-value
Intercept	163.01	12.40	13.15	0.00004*
Temperature (X <sub>1</sub> ) (L)	-24.04	7.59	-3.17	0.0098*
Temperature (X <sub>1</sub> ) (Q)	-79.20	11.17	-7.09	0.0020*
pH (X <sub>2</sub> ) (L)	-22.30	7.59	-2.94	0.0114*
pH (X <sub>2</sub> ) (Q)	-65.30	11.17	-5.84	0.0029*
Agitation (X <sub>3</sub> ) (L)	-23.94	7.59	-3.15	0.0099*
Agitation (X <sub>3</sub> ) (Q)	-32.84	11.17	-2.93	0.0113*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	6.67	10.73	0.62	0.1881
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	18.20	10.73	1.70	0.0330*
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	3.17	10.73	0.30	0.4482

Lack of fit: p=0.059; R<sup>2</sup>= 0.96; \*Significance at p<0.05.

Agitation was a significant variable (p= 0.0099) in this study. Salihi *et al.* (29), Teng and Xu (37) studied the effect of agitation on lipase production and concluded that this variable increases enzyme synthesis. High levels of agitation cause higher shear force, which can cause negative effects in cellular growth and lipase activity (19).

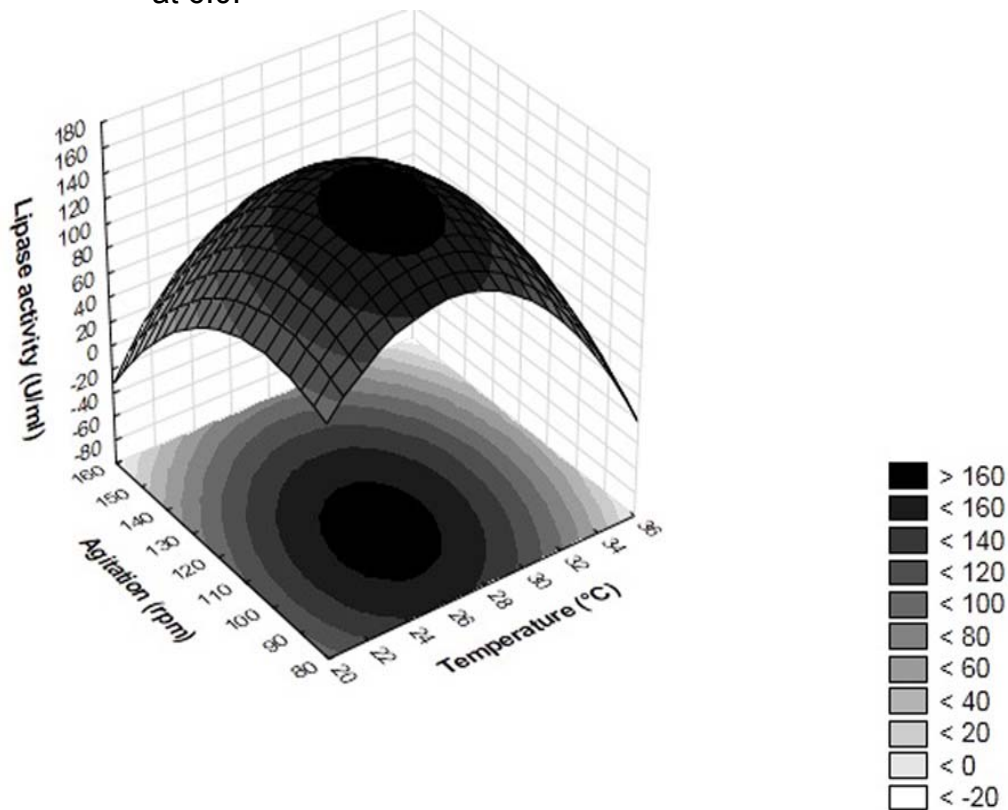
Experimental data from lipase production were analyzed in order to construct the second order polynomial equation (Eq.3):

$$Y_1 = 163.01 - 24.04 x_1 - 22.31 x_2 - 23.94 x_3 + 6.67 x_1 x_2 + 18.20 x_1 x_3 + 3.17 x_2 x_3 - 79.20 x_1^2 - 65.30 x_2^2 - 32.84 x_3^2 \quad (\text{Eq.3})$$

where Y<sub>1</sub> is the lipase activity response, x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub> and x<sub>3</sub> are the codified variables, temperature, pH and agitation, respectively. A high coefficient of determination (R<sup>2</sup> = 0.96) and no significant lack of fit (p= 0.059) were observed, indicating that the proposed model can be used for predictive purposes.

The response surface (Figure 3) shows sub-regions more suitable to high lipase production values with the variable x<sub>1</sub> = 0 and the variable x<sub>3</sub> = 0 in codified values.

**Figure 3** - Response surface for independent variables temperature (°C) and agitation (rpm) for the lipase production by *T. koningii*. The pH was fixed at 6.0.



The best experimental production was 163.01 U/ml (28 °C, pH 6.0 and 120 rpm) and the value predicted was 166.77 U/ml (28 °C, pH 6.0 and 105 rpm). To confirm the validity of the statistical model, five repetitions of the predicted conditions were carried out and the average production was 175.20 U/ml. This result did not show a significant difference from the predicted optimum value. The value obtained, 175.20 U/ml for *T. koningii*, is a promising value when compared to other microorganisms, such as *A. carneus* (12.7 U/ml) (14), *C. cylindracea* (20.26 U/ml) (28) and *R. arrhizus* (3.98 U/ml) (23).

## CONCLUSIONS

The culture conditions were optimized, and the highest enzyme production was 175.20 U/ml, obtained at 10 ml/l of olive oil, 120 hours, 28 °C, pH 6.0 and 105 rpm. The statistical methodology proved to be an efficient technique for identifying critical variables on lipase production. *T. koningii* isolated from the Amazon rainforest

proved to be a promising producer of a lipase with potential application in several areas of biotechnology.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CAPES, Brazil and Fundação Araucária for financial support.

## REFERENCES

1. Abdel-Fattah, YR, Soliman, NA, Yousef, SM, El-Helow, ER (2012) Application of experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1. *J Gene Eng Biotechnol* 10: 193–200.
2. Bailey, MJ, Adamitsch, B, Rautio, J, Von Weymarn, N, Saloheimo, M (2007) Use of a growth-associated control algorithm for efficient production of a heterologous laccase in *Trichoderma reesei* in fed-batch and continuous cultivation. *Enzyme Microb Technol* 41: 484–491.
3. Basheer, SM, Chellappan, S, Beena, PS, Sukumaran, RK, Elyas, KK, Chandrasekaran, M (2011) Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol* 28: 627–638.
4. Cazetta, ML, Celligoi, MAPC, Buzato, JB, Scarmino, IS (2007) Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresour Technol* 98: 2824–2828.
5. Colla, LM, Rizzardi, J, Pinto, MH, Reinehr, CO, Bertolin, TE, Costa, JAV (2010) Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. *Bioresour Technol* 101: 8308–8314.
6. Dandavate, V, Jinjala, J, Keharia, H, Madamwar, D (2009) Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour Technol* 100: 3374–3381.
7. de Oliveira, MR, da Silva, RSSF, Buzato, JB, Celligoi, MAPC (2007) Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem Eng J* 37: 177–183.
8. Delabona, PS, Farinas, CS, Silva, MR, Azzoni, SF, Pradella, JGC (2012) Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest

- with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresour Technol* 107: 517–521.
9. Dheeman, DS, Antony-Babu, S, Frías, JM, Henehan, GTM (2011) Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). *J Mol Catal B: Enzym* 72: 256–262.
  10. Fang, Y, Lu, Y, Lv, F, Bie, X, Zhao, H, Wang, Y, Lu, Z (2009) Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. *Enzyme Microb Technol* 44: 84–88.
  11. Hasan, F, Shah, AA, Hameed, A (2006) Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Ann Microbiol* 56: 247–252.
  12. Hasan-Beikdashti, M, Forootanfar, H, Safiarian, MS, Ameri, A, Ghahremani, MH, Khoshayand, MR, Faramarzi, MA (2012) Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Taiwan Inst Chem Eng* 43: 670–677.
  13. He, Y-Q, Tan, T-W (2006) Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *J Mol Catal B: Enzym* 43: 9–14.
  14. Kaushik, R, Saran, S, Isar, J, Saxena, RK (2006) Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *J Mol Catal B: Enzym* 40: 121–126.
  15. Kumar, R, Mahajan, S, Kumar, A, Singh, V (2011) Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnol* 28 (1): 187–192.
  16. Kumar, S, Mathur, A, Singh, V, Nandy, S, Khare, SK, Negi, S (2012) Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. *Bioresour Technol* 120: 300–304.
  17. Lima, VMG, Krieger, N, Sarquis, MIM, Mitchell, DA, Ramos, LP, Fontana, JD (2003). Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. *Food Technol Biotechnol* 41 (2): 105–110.
  18. Lin, Y, Chen, G, Ling, M, Liang, Z (2010) A method of purification, identification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma koningii* AS3.2774. *J Microbiol Methods* 83: 74–81.
  19. Liu, C-H, Chen, C-Y, Wang, Y-W, Chang, J-S (2011) Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Biochem Eng J* 58–59: 96–102.
  20. Liu, C-H, Huang, C-C, Wang, Y-W, Chang, J-S (2012) Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *J Taiwan Inst Chem Eng* 43: 511–516.

21. Liu, J, Luo, J, Ye, H, Sun, Y, Lu, Z, Zeng, X (2010) Medium optimization and structural characterization of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydr Polym* 79: 206–213.
22. Maldonado, RR, Burkert, JFM, Mazutti, MA, Maugeri, F, Rodrigues, MI (2012) Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. *Biocatal Agric Biotechnol* 1: 147–151.
23. Rajendran, A, Thangavelu, V (2009) Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Sci Technol* 42: 985–992.
24. Ramani, K, Kennedy, LJ, Ramakrishnan, M, Sekaran, G (2010) Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. *Process Biochem* 45: 1683–1691.
25. Rigo, E, Ninow, JL, Di Luccio, M, Oliveira, JV, Polloni, AE, Remonato, D, Arbter, F, Vardanega, R, Oliveira, D, Treichel, H (2010) Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. *Food Sci Technol* 43: 1132–1137.
26. Romdhane, IB-B, Fendri, A, Gargouri, Y, Gargouri, A, Belghith, H (2010) A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochem Eng J* 53: 112–120.
27. Romero, CM, Pera, LM, Loto, F, Vallejos, C, Castro, G, Baigori, MD (2012) Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. *Biocatal Agric Biotechnol* 1: 25–31.
28. Salihu, A, Alam, Md, Z, Abdulkarim, MI, Salleh, HM (2011) Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *J Mol Catal B: Enzym* 69: 66–73.
29. Salihu, A, Alam, MdZ, Abdulkarim, MI, Salleh, HM (2011) Effect of process parameters on lipase production by *Candida cylindracea* in stirred tank bioreactor using renewable palm oil mill effluent based medium. *J Mol Catal B: Enzym* 72: 187–192.
30. Sánchez-Otero, MG, Ruiz-López, II, Ávila-Nieto, DE, Oliart-Ros, RM (2011) Significant improvement of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkalophilic lipase production using Response Surface Methodology. *New Biotechnol* 28 (6): 761–766.
31. Sharma, A, Bardhan, D, Patel, R (2009) Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *Indian J Biochem Biophys* 46: 179–183.
32. Sifour, M, Zaghloul, TI, Saeed, HM, Berekaa, MM, Abdel-Fattah, YR (2010) Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus*

- stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental. *New Biotechnol* 27 (4): 330-336.
33. Statistica for Windows v. 9.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA (2009).
  34. Stergiou, P-Y, Foukis, A, Sklivaniti, H, Zacharaki, P, Papagianni, M, Papamichael, EM (2012) Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. *Appl Biochem Biotechnol* 168: 672–680.
  35. Tan, T, Zhang, M, Wang, B, Ying, C, Deng, L (2003) Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochem* 39: 459-465.
  36. Tan, T, Zhang, M, Xu, J, Zhang, J (2004) Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. *Process Biochem* 39: 1495–1502.
  37. Teng, Y, Xu, Y (2008) Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. *Bioresour Technol* 99: 3900–3907.
  38. Villeneuve, P, Muderhwa, JM, Graille, J, Haas, MJ (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym* 9: 113-148.
  39. Vogel, H (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *J Microb Genet Bull* 13: (1) 42-43.
  40. Wang, D, Xu, Y, Shan, T (2008) 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. *Biochem Eng J* 41: 30–37.
  41. Wang, W-F, Li, T, Qin, X-LI, Ning, Z-X, Yang, B, Wang, Y-H (2012) Production of lipase SMG1 and its application in synthesizing diacylglycerol. *J Mol Catal B: Enzym* 77: 87–91.
  42. Winkler, UK, Stuckmann, M (1979) Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* 138 (3): 663-670.
  43. Xiong, Y-H, Liu, J-Z, Song, H-Y, Ji, L-N (2004) Enhanced production of extracellular ribonuclease from *Aspergillus niger* by optimization of culture conditions using response surface methodology. *Biochem Eng J* 21: 27–32.
  44. Yoo, H-Y, Simkhada, JR, Cho, SS, Park, DH, Kim, SW, Seong, CN, Yoo, JC (2011) A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour Technol* 102: 6104–6111.
  45. Zhang, L, Liu, Y, Niu, X, Liu, Y, Liao, W (2012) Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by

*Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis.  
*Biomass Bioenergy* 37: 16-24.

## 5.2 ARTIGO 2

**PRODUÇÃO DE LIPASE EM EFLUENTE DE LACTICÍNIO POR UM NOVO ISOLADO DE *TRICHODERMA KONINGII***

Thiago Andrade Marques<sup>a</sup>, Dionísio Borsato<sup>b</sup>, Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi<sup>a\*</sup>

**Resumo:** A produção de lipase por um novo isolado de *Trichoderma koningii* foi avaliada utilizando efluente líquido de laticínio como meio de fermentação. O resíduo apresentou as seguintes características: pH 9,0; DQO de 1.376,00 mg/L; lipídios totais de 70,00 mg/L; proteínas totais de 189,49 mg/L e açúcares totais de 55,83 mg/L. Um delineamento experimental de misturas com 4 componentes (óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel) foi empregado para a otimização da produção da enzima. A maior produção de lipase foi 1.327,28 U/mL (5 mL/L de óleo de oliva; 5,62 mL/L de Tween 80 e 15 mL/L de meio de Vogel), a qual foi 123 vezes maior que a produção com o efluente sem suplementação. Os componentes Tween 80 e o meio de Vogel estimularam significativamente a produção da enzima. Os resultados demonstraram que o efluente de laticínio é um promissor substrato para a produção de lipase por *T. koningii*.

**Palavras chave:** Lipase. *Trichoderma koningii*. Efluente de laticínio. Planejamento de misturas. Otimização.

**Introdução**

A indústria de laticínio é a mais poluente entre as indústrias alimentícias, devido ao elevado consumo de água e a grande quantidade de efluente gerado (0,2 a 10 litros de efluente por litro de leite processado) [1]. Este resíduo apresenta uma alta concentração de matéria orgânica, como lipídios, proteínas e carboidratos, além de uma alta concentração de sólidos em suspensão e elevadas taxas de DBO e DQO [2].

Os resíduos lipídicos gerados pelas práticas industriais e agrícolas são de difícil tratamento e baixo valor, entretanto eles podem ser utilizados como materiais para aplicações biotecnológicas, em particular para a síntese de metabólitos de alto

---

<sup>a</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Centre of Exact Science, State University of Londrina

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Centre of Exact Science, State University of Londrina, Post-Box 10.011-Londrina, Parana State, Brazil

<sup>a\*</sup> Corresponding author. Tel.: +55 43 3371-4270 - E-mail address: macelligoi@uel.br

valor, como por exemplo, ácidos orgânicos, biossurfactantes e lipases [3]. Salihi et al. [4] pesquisaram a aplicação do efluente industrial de óleo de palma na produção de lipase por *Candida cylindracea* aplicando delineamentos fatoriais. Os autores desenvolveram um meio de fermentação variando as concentrações de peptona, Tween 80 e inóculo inicial e atingiram uma produção de 20,26 U/mL, que correspondeu a um aumento de 5,19 vezes na síntese da lipase quando comparada ao meio sem otimização, comprovando que o resíduo foi uma boa alternativa de substrato de baixo custo.

D'Annibale et al. [5] com águas residuais da fabricação de óleo de oliva avaliaram a produção de lipase por *Penicillium citrinum* e verificaram que neste resíduo, a adição da fonte de nitrogênio  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , levou a um aumento significativo na produção da enzima. A adição de óleos vegetais ao meio de fermentação também foi avaliada e não afetou a produção. Assim, para otimizar a produção, três variáveis: pH inicial;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  e extrato de levedura foram estudadas e a máxima atividade de lipase alcançada foi 1272 U/mL (3,0 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1,0 g/L de extrato de levedura, pH 6,1), após 188 horas de fermentação.

As lipases microbianas são amplamente diversificadas em suas propriedades enzimáticas e na especificidade pelo substrato, o que as tornam atrativas para aplicação industrial [6]. Devido as suas características são aplicadas em diferentes áreas, como na síntese de emulsificantes para indústria de alimentos [7], no tratamento de efluentes lipídicos [8], na produção de biolubrificantes [9], na adição em detergentes para roupas [10] e nas reações químicas de produção de biodiesel [11].

Um dos fatores mais importantes para o aumento da atividade de lipase é a fonte de carbono, pois essas enzimas são indutivas e geralmente são produzidas na presença de lipídios como fonte de carbono [6]. O óleo de oliva é uma das principais fontes de carbono utilizadas na produção de lipase, seu efeito estimulador na síntese da enzima é explicado pelo seu alto teor de ácido oléico [12]. Lakshmi et al. [13] descreveram que a produção de lipase está relacionada com a porcentagem de ácidos graxos C18 insaturados presente nos óleos. Outra fonte que pode ser empregada são os surfactantes como Tween (20, 40, 60 e 80) e Triton X-100 que podem aumentar a permeabilidade celular, facilitando dessa forma a liberação de diversas moléculas através da membrana celular [14].

O delineamento experimental de misturas tem sido empregado na otimização de meios de fermentação [15], em pesquisas de extração de compostos químicos [16], em estudos da composição de filmes de amido [17], entre outras aplicações. Giese et al. [18] otimizaram a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase por *Botryosphaeria rhodina* e *Trichoderma harzianum* utilizando essa metodologia estatística. Os autores investigaram diferentes concentrações de botriosferana (exopolissacarídeo), glicose e lactose na produção da enzima pelos fungos. Para *B. rhodina* a glicose e a lactose estimularam a produção da enzima, enquanto a botriosferana apresentou um efeito favorável quando usada em conjunto com um dos outros substratos na produção de  $\beta$ -1,3-glucanase por *T. harzianum*. Delabona et al. [19] investigaram o efeito da concentração de diferentes componentes nutricionais (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e sacarose) empregando um delineamento experimental de misturas, na produção de glicosil hidrolases por uma nova cepa de *T. harzianum*. Os autores concluíram que a mistura dos componentes pode maximizar significativamente a taxa de biossíntese das enzimas, especialmente das xilanases que aumentaram em 2 vezes.

Considerando que um dos maiores custos na produção de enzimas é o meio de fermentação e que o efluente de laticínio é um resíduo de baixo custo com boa qualidade nutricional, o presente estudo teve como objetivo otimizar a produção de lipase de *T. koningii*, isolado da floresta Amazônica, por um delineamento experimental de misturas.

## **Material e métodos**

### *Microrganismo e preparo do inóculo*

*T. koningii* foi isolado do solo da floresta Amazônica e identificado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A cepa foi crescida em batata, dextrose e ágar (BDA), em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio, a 28 °C por 4 dias e repicadas a cada 15 dias. O microrganismo foi mantido e preservado a 4 °C. Após o período de incubação, a suspensão de esporos foi preparada pela adição de solução salina 0,9% (v/v) nos frascos e usada como inóculo a  $10^6$  esporos/mL.

### *Efluente de laticínio e condições de fermentação*

A amostra do efluente de laticínio utilizada como meio de fermentação foi coletada no tanque de homogeneização com as seguintes características: pH 9,0; 1.376,00 mg/L de DQO; 70,00 mg/L de lipídios totais; 189,49 mg/L de proteínas totais e 55,83 mg/L de açúcares totais. O pH foi ajustado para 6,0 para todos os experimentos e esterilizados a 121 °C por 15 minutos. O volume de inóculo foi fixado em 1% (v/v) para cada 25 mL do efluente, em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os cultivos foram incubados em shaker orbital a 105 rpm e 28 °C. Essas condições de cultivo foram padronizadas por experimentos prévios (dados não publicados).

Para verificar a produção de lipase no efluente, foram realizadas duas fermentações, uma sem suplementação (5 repetições) e outra com a suplementação com óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel [20], para isso foi empregado um delineamento experimental de misturas (Tabela 1). Após 5 dias, os cultivos foram interrompidos por filtração e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade de lipase.

### *Caracterização do efluente*

#### *Teor lipídico*

Os lipídios totais do efluente foram determinados segundo o método de Frings e Dunn [21]. Como padrão foi utilizado o ácido oléico (100 µg/mL de etanol absoluto). Para a determinação dos lipídios foi utilizado 1 mL do efluente evaporado, adicionando 2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado e incubando em banho fervente por 10 minutos. Em 1 mL dessa solução foram adicionados 5,0 mL de fosfovanilina (200 mL de vanilina 0,6 % p/v; 800 mL de ácido fosfórico concentrado). Os tubos foram incubados por 15 minutos a 37 °C. As leituras das absorvâncias ocorreram a 540 nm.

#### *Teor de proteínas e açúcares totais*

As proteínas foram quantificadas segundo o método de Hartree [22], utilizando como padrão a solução de soro albumina bovina (200 µg/mL). As absorvâncias foram medidas a 650 nm.

Os açúcares totais foram determinados pelo método de Dubois et al. [23], utilizando um padrão de glicose (100 µg/mL). As absorvâncias foram medidas a 490 nm.

#### *Determinação da atividade de lipase*

A atividade de lipase de todos os experimentos foi determinada utilizando o palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NPP) como substrato, baseado no método de Winkler e Stuckmann [24]. O sobrenadante foi incubado com o *p*-NPP (8,0 mM solubilizado em isopropanol), tampão Tris-HCl 50mM (pH 8,0) contendo Triton X-100 (0,4 % p/v), a 37 °C por 10 minutos. A liberação *p*-nitrofenol (*p*-NP) foi medida a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática (U/mL) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol/min de *p*-nitrofenol (*p*-NP).

#### *Delineamento experimental de misturas*

Para otimizar as condições da produção de lipase por *T. koningii* em efluente de laticínio foi empregado um delineamento experimental de misturas, simplex-centroide, com 4 componentes, óleo de oliva ( $X_1$ ), Tween 80 ( $X_2$ ), glicerol ( $X_3$ ) e meio de Vogel ( $X_4$ ), totalizando 17 experimentos. A resposta analisada foi a atividade de lipase (U/mL) (Tabela 1). O glicerol foi selecionado de acordo com uma revisão de literatura preliminar e o óleo de oliva, Tween 80 e o meio de Vogel foram selecionados em experimentos prévios (dados não publicados). Em um delineamento experimental de misturas as proporções não podem ser negativas e se expressadas como frações de misturas, elas devem somar uma unidade [25]. Os volumes dos 4 componentes foram adicionados de acordo com a Tabela 1 e o volume final de 25 mL foi completado com efluente.

No delineamento experimental de misturas simplex-centroide, os dados sobre a resposta são recolhidos e o modelo polinomial é montado com o mesmo número de parâmetros a ser estimado, de acordo com a equação canônica (Eq.1) [25]:

$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_i \sum_{<1}^q \beta_{ij} x_i x_j + \sum_i \sum_{<1}^q \sum_k^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \dots + \beta_{12\dots q} x_1 x_2 \dots x_q \quad (\text{Eq.1})$$

onde Y é a estimativa da variável resposta (atividade de lipase),  $\beta_i$  é o coeficiente para o efeito linear,  $\beta_{ij}$  é o coeficiente para o efeito da interação binária,  $\beta_{ijk}$  é o coeficiente para o efeito da interação ternária e x é o nível codificado da variável.

Os resultados foram analisados utilizando o programa Statistica v.9.0 [26], para análise de variância (ANOVA) com 5% de significância e análise múltipla de regressão.

## Resultados e discussão

### *Produção de lipase em efluente de laticínio*

A produção de lipase por *T. koningii* foi inicialmente avaliada utilizando o efluente de laticínio sem suplementação e a atividade máxima obtida foi de 10,74 U/mL. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade de *T. koningii* produzir lipase no efluente, porém a suplementação pode favorecer esta produção. Outros resíduos foram utilizados na produção dessa enzima, como foi demonstrado por Brozzoli et al. [27] que estudaram a produção de lipase por *C. cylindracea* cultivada em efluente da produção de óleo de oliva. Este resíduo foi utilizado sem suplementação e suplementado com óleo de oliva em várias concentrações (0 a 10 g/L). A maior produção de lipase (8,74 U/mL) foi verificada com suplementação de 3,0 g/L de óleo de oliva e a máxima atividade (3,20 U/mL) encontrada sem suplementação foi 2,96 vezes menor, comprovando a importância da suplementação do efluente.

Considerando a baixa atividade de lipase obtida nas fermentações sem suplementação, foi estudada a suplementação do efluente com óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel, por um delineamento experimental de misturas (Tabela 1). Os resultados do delineamento demonstraram que a atividade de lipase variou de 16,64 U/mL (ensaio 1: 20 mL/L de óleo de oliva e a ausência do Tween 80, glicerol e meio de Vogel) a 1.313,58 U/mL (ensaio 12: 6,6 mL/L de óleo de oliva; 4,99 mL/L de Tween 80; sem glicerol e 13,2 mL/L de meio de Vogel). A grande variação da

atividade enzimática indica que as combinações dos componentes estudados influenciaram fortemente na produção da enzima.

### **(Tabela 1)**

Neste estudo os componentes Tween 80 ( $p=0,005$ ) e meio de Vogel ( $p=0,0002$ ) foram significativos na produção de lipase, porém o óleo de oliva ( $p=0,092$ ) e o glicerol ( $p=0,086$ ) não foram significativos (Tabela 2). Sifour et al. [28] avaliaram o efeito do óleo de oliva nas concentrações de 1,0 e 5,0 % (v/v) na produção de lipase por *Geobacillus stearothermophilus*. O óleo de oliva não influenciou significativamente na produção da enzima. Porém, trabalhos descritos por Hasan-Beikdashti et al. [29] e Rajendran e Thangavelu [30] verificaram que o óleo de oliva estimulou significativamente a produção de lipase por *Stenotrophomonas maltophilia* e *Rhizopus arrhizus*, respectivamente.

### **(Tabela 2)**

O componente Tween 80 apresentou efeito positivo na produção de lipase por *T. koningii*. No ensaio 2, o efluente foi suplementado com Tween 80 (15 mL/L) e foi verificado uma atividade de lipase de 50,12 U/mL, demonstrando que esse surfactante pode ser utilizado como única fonte de carbono para a produção da enzima. Wang, Xu e Shan [31] testaram vários substratos lipídicos na produção de lipase por *R. chinensis* e descreveram que os substratos com ácido oleico em sua estrutura química, aumentaram a produção da enzima, como por exemplo, Tween 80 que apresentou efeito positivo de 177 %. Silva et al. [32] estudaram o efeito de diferentes surfactantes na produção de lipase por *Metarhizium anisopliae* e as maiores atividades enzimáticas foram obtidas em cultivos com SDS (dodecil sulfato de sódio) (4,54 U/mL) e Tween 80 (4,15 U/mL). Os autores concluíram que os surfactantes podem alterar a permeabilidade celular aumentando a secreção de proteínas ou facilitando o contato entre enzima e substrato. O efeito positivo do Tween 80 foi relatado na produção de lipase de *Botryosphaeria ribis* [33] e de *Bacillus pumilus* [6].

O glicerol foi testado na produção de lipase por *T. koningii*, considerando que pode ser utilizado como fonte de carbono, porém nesse estudo ele não foi significativo. No ensaio 3, que apresentava o efluente suplementado somente com 10 mL/L de glicerol, foi observado uma baixa atividade de lipase (17,20 U/mL). Lin,

Wang e Sung et al. [34] avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono (glicose, galactose, frutose, xilose, sacarose, glicerol, sorbitol, manitol e Tween 80) na produção de lipase por *Antrodia cinnamomea* e a máxima atividade enzimática (26,69 mU/mL) foi verificada em cultivos com glicerol (5% p/v). Gupta, Mehra e Gupta [35] avaliaram várias concentrações de glicerol (10; 20 e 30 mL/L) na produção de lipase por *Bacillus* sp. O glicerol foi significativo na produção da enzima e a máxima atividade enzimática (62 U/mL) foi obtida com glicerol a 10 mL/L.

O meio de Vogel é um meio de cultivo basal utilizado principalmente para o crescimento de fungos e demonstrou efeito positivo na produção de lipase por *T. koningii*. Nesse meio há grande quantidade de sais minerais como o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e soluções de elementos traços e biotina [20]. As maiores produções de lipase foram 1.313,58 U/mL (ensaio 12), 845,00 U/mL (média dos pontos centrais), 770,04 U/mL (ensaio 9) e 658,11 U/mL (ensaio 14), todas apresentavam meio de Vogel.

A análise de variância (ANOVA) indicou que os modelos linear ( $p= 0,60$ ) e quadrático ( $p= 0,12$ ) não foram significativos, enquanto modelo especial cúbico foi significativo ( $p= 0,00005$ ). A partir dos resultados experimentais, o modelo especial cúbico foi construído segundo a equação canônica (Eq.2):

$$Y_1 = 16,64 x_1 + 50,12 x_2 + 17,20 x_3 + 140,74 x_4 + 524,19 x_1x_2 + 64,63 x_1x_3 + 183,63 x_1x_4 - 92,09 x_2x_3 + 2698,39 x_2x_4 - 113,45 x_3x_4 + 5158,64 x_1x_2x_3 + 23381,60 x_1x_2x_4 + 462,17 x_1x_3x_4 + 8418,95 x_2x_3x_4 \quad (\text{Eq.2})$$

onde  $Y_1$  é a resposta atividade de lipase,  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  e  $x_4$  são as variáveis codificadas, óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel, respectivamente.

A falta de ajuste não foi significativa ( $p= 0,99$ ) e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,99, ou seja, 99 % da variabilidade dos dados experimentais são explicados pelo modelo. Essas características indicam que a equação obtida pode ser utilizada para fins preditivos.

As interações ternárias demonstraram forte efeito, principalmente a interação entre as variáveis  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_4$  ( $p= 0,000002$ ). A região de combinação ternária entre o óleo de oliva, Tween 80 e o meio de Vogel, pode ser observada através da superfície de contorno apresentada na Figura 1.

**(Figura 1)**

O modelo preditivo indicou que a máxima produção teórica de 1.343,60 U/mL ocorre nas condições: 5 mL/L de óleo de oliva; 5,62 mL/L de Tween 80; 15 mL/L de meio de Vogel e sem glicerol (Figura 2). A validação do modelo foi realizada nas condições ótimas descritas e o teste t para uma amostra simples foi aplicado com 5% de significância. A produção de lipase média foi de 1.327,28 U/mL, não apresentando diferença significativa do valor ótimo predito.

### **(Figura 2)**

A otimização levou a um aumento de 123 vezes da produção da enzima, comparada com a produção verificada sem a suplementação do efluente (10,72 U/mL). A alta produção de lipase verificada nesse estudo demonstra a possibilidade da utilização de efluente de laticínio, um resíduo de baixo valor e rico em compostos orgânicos, como meio de fermentação para a produção de enzimas e outras biomoléculas.

## **Conclusões**

O novo isolado do solo da floresta Amazônica, *T. koningii* demonstrou alta produção de lipase utilizando efluente de laticínio como meio de fermentação. O resíduo líquido apresentou a composição de lipídios totais de 70,00 mg/L; proteínas totais de 189,49 mg/L e açúcares totais de 55,83 mg/L. Apesar da qualidade nutricional do efluente, nas fermentações sem suplementação foi verificada baixa atividade enzimática (10,72 U/mL). A otimização por um delineamento experimental de misturas levou a um aumento de 123 vezes na produção e a máxima atividade de lipase de 1.327,28 U/mL ocorreu nas condições: 5 mL/L de óleo de oliva; 5,62 mL/L de Tween 80 e 15 mL/L de meio de Vogel. Esta metodologia estatística mostrou ser uma eficiente ferramenta para a seleção de componentes do meio de fermentação, que podem estimular a produção de lipase.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem pelo suporte financeiro fornecido pela Capes-Brasil e pela Fundação Araucária.

## Referências

- [1] Vourch, M. Balannec, B. Chaufer, B. Dorange, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. *Desalination*. 219 (2008) 190–202.
- [2] Farizoglu, B. Uzuner, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. *Biochem. Eng. J.* 57 (2011) 46–54.
- [3] Mafakher, L. Mirbagheri, M. Darvishi, F. Nahvi, I. Zarkesh-Esfahani, H. Emtiazi, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnol.* 27 (4) (2010) 337- 340.
- [4] Salihu, A. Alam, Md. Z. Abdulkarim, M. I. Salleh, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 69 (2011) 66–73.
- [5] D’Annibale, A. Brozzoli, V. Crognale, S. Gallo, A. M. Federici, F. Petruccioli, M. Optimisation by response surface methodology of fungal lipase production on olive mill wastewater. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006) 1586–1593.
- [6] Kumar, R. Mahajan, S. Kumar, A. Singh, V. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. *New Biotechnol.* 28 (1) (2011) 187-192.
- [7] H-Kittikun, A. Kaewthong, W. Cheirsilp, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. *Biochem. Eng. J.* 40 (2008) 116–120.
- [8] Basheer, S. M. Chellappan, S. Beena, P. S. Sukumaran, R. K. Elyas, K. K. Chandrasekaran, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: Production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnol.* 28 (2011) 627-638.
- [9] Åkerman, C. O. Hagström, A. E. V. Mollaahmad, M. A. Karlsson, S. Hatti-Kaul, R. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimization of trimethylolpropane oleate production. *Process Biochem.* 46 (2011) 2225–2231.
- [10] Romdhane, I. B-B. Fendri, A. Gargouri, Y. Gargouri, A. Belghith, H. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochem. Eng. J.* 53 (2010) 112–120.
- [11] Fedosov, S. N. Brask, J. Pedersenc, A. K. Nordblad, M. Woodley, J. M. Xu, X. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 85-86 (2013) 156–168
- [12] 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. *Biochem. Eng. J.* 41 (2008) 30–37.

- [13] Lakshmi, B. S. Kanguane, P. Abraham, B. Pennathur, G. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). Letters in Applied Microbiology. 29 (1999) 66-70.
- [14] Silva, W. O. B. Matidieri, S. Schrank, A. Vainstein, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Process Biochem. 40 (2005) 321-326.
- [15] Yin, H. Chen, Z. Gu, Z. Han, Y. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. Food Sci. Technol. 42 (2009) 327-331.
- [16] Seabra, I. J. Braga, M. E. M. de Sousa, H. C. Statistical mixture design investigation of CO<sub>2</sub>-Ethanol-H<sub>2</sub>O pressurized solvent extractions from tara seed coat. J. of Supercritical Fluids 64 (2012) 9-18.
- [17] Flores, S. K. Costa, D. Yamashita, F. Gerschenson, L. N. Grossmann, M. V. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. Materials Science and Engineering C 30 (2010) 196-202.
- [18] Giese, E. C. Dekker, R. F. H. Scarminio, I. S. Barbosa, A. M. da Silva, R. Comparison of  $\beta$ -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and *Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. Biochem. Eng. J. 53 (2011) 239-243.
- [19] Delabona, P. S. Farinas, C. S. Silva, M. R. Azzoni, S. F. Pradella, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. Bioresour.Technol. 107 (2012) 517-521.
- [20] Vogel, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. Micro. Genet. Bullet. 13 (1) (1956) 42-43.
- [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. 53 (1) (1970) 89-91.
- [22] Hartree, E. F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analytical Biochemistry. 48 (1972) 422-427.
- [23] Dubois, M. Gilles, K. A. Hamilton, J. K. Rebers, P. A. Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. Analytical Chemistry. 9 (1956) 77-103.
- [24] Winkler, U. K. Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 138 (3) (1979) 663 - 670.

- [25] Cornell, J. A. Experiments with mixtures - designs, models and the analysis of mixture data. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1990.
- [26] Statistica for Windows v. 9.0, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA (2009).
- [27] Brozzoli, V. Crognale, S. Sampedro, I. Federici, F. D'annibale, A. Petruccioli, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 3395–3402.
- [28] Sifour, M. Zaghoul, T. I. Saeed, H. M. Berekaa, M. M. Abdel-Fattah, Y.R. Enhanced production of lipase by the thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5 using statistical experimental. *New Biotechnol.* 27 (4) (2010) 330-336.
- [29] Hasan-Beikdashti, M. Forootanfar, H. Safiarian, M. S. Ameri, A. Ghahremani, M. H. Khoshayand, M. R. Faramarzi, M. A. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 43 (2012) 670–677.
- [30] Rajendran, A. Thangavelu, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. *Food Sci. Technol.* 42 (2009) 985–992.
- [31] 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. *Biochem. Eng. J.* 41 (2008) 30–37.
- [32] Messias, J. M. da Costa, B. Z. Lima, V. M. G. Dekker, R. F. H. Rezende, M. I. Krieger, N. Barbosa, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 426–431.
- [33] Lin, E-S. Wang, C-C. Sung, S-C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. *Enzyme Microb. Technol.* 39 (2006) 98–102.
- [34] Gupta N. Mehra, G. Gupta, R. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology. *Canadian Journal of Microbiology* 50 (2004) 361–368.

## Tabelas

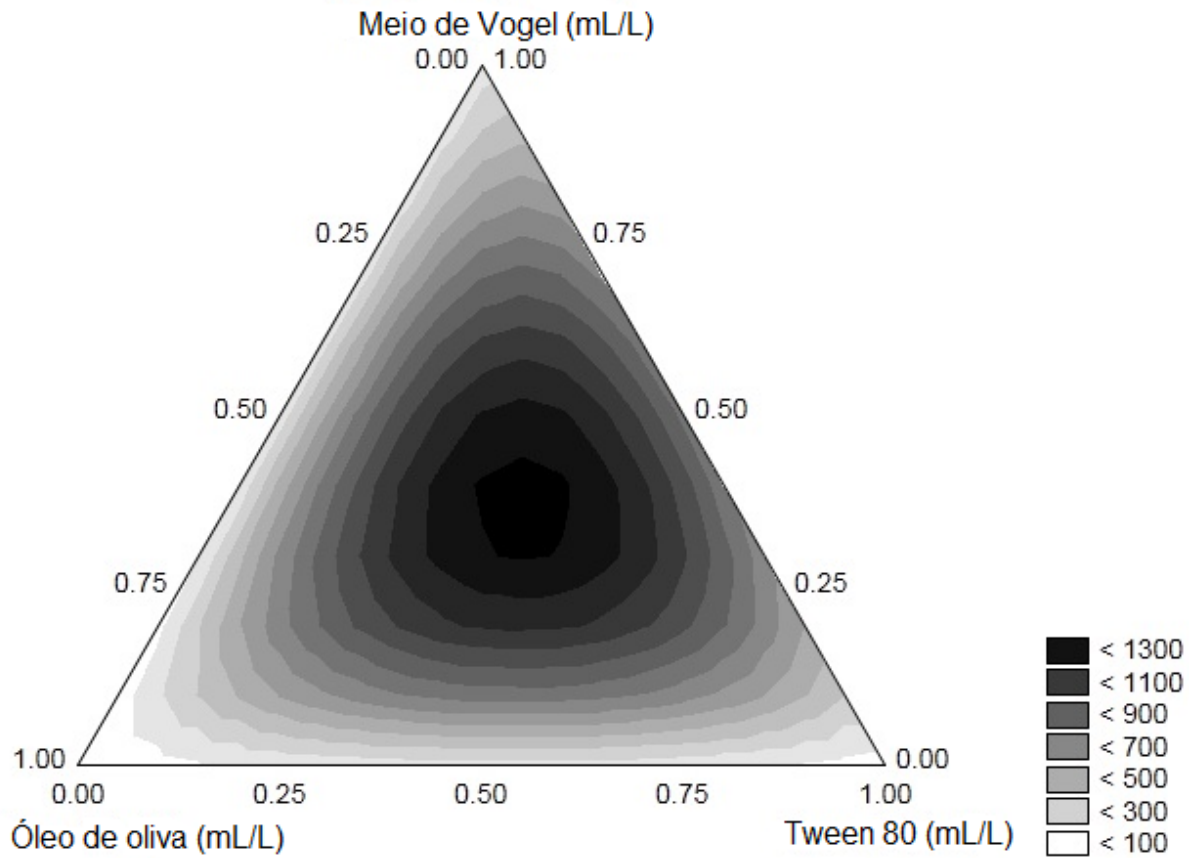
**Tabela 1** - Delineamento experimental de misturas para avaliação dos componentes: óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel na produção de lipase por *T. koningii*, em efluente de lacticínio.

Ensaio	Misturas	Componentes				Atividade de Lipase (U/mL)
		Óleo de Oliva (mL/L)	Tween 80 (mL/L)	Glicerol (mL/L)	Meio de Vogel (mL/L)	
		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>1</sub>
1	(1;0;0;0)	20	0	0	0	16,64
2	(0;1;0;0)	0	15	0	0	50,12
3	(0;0;1;0)	0	0	10	0	17,20
4	(0;0;0;1)	0	0	0	40	140,74
5	(0,5;0,5;0;0)	10	7,5	0	0	164,44
6	(0,5;0;0,5;0)	10	0	5	0	33,09
7	(0,5;0;0;0,5)	10	0	0	20	124,61
8	(0;0,5;0,5;0)	0	7,5	5	0	10,65
9	(0;0,5;0;0,5)	0	7,5	0	20	770,04
10	(0;0;0,5;0,5)	0	0	5	20	50,62
11	(0,33;0,33;0,33;0)	6,6	4,99	3,3	0	274,20
12	(0,33;0,33;0;0,33)	6,6	4,99	0	13,2	1.313,58
13	(0;0;0,33;0,33)	6,6	0	3,3	13,2	90,25
14	(0;0,33;0,33;0,33)	0	4,99	3,3	13,2	658,11
15	(0,25;0,25;0,25;0,25)	5	3,75	2,5	10	848,07
16	(0,25;0,25;0,25;0,25)	5	3,75	2,5	10	851,36
17	(0,25;0,25;0,25;0,25)	5	3,75	2,5	10	835,56

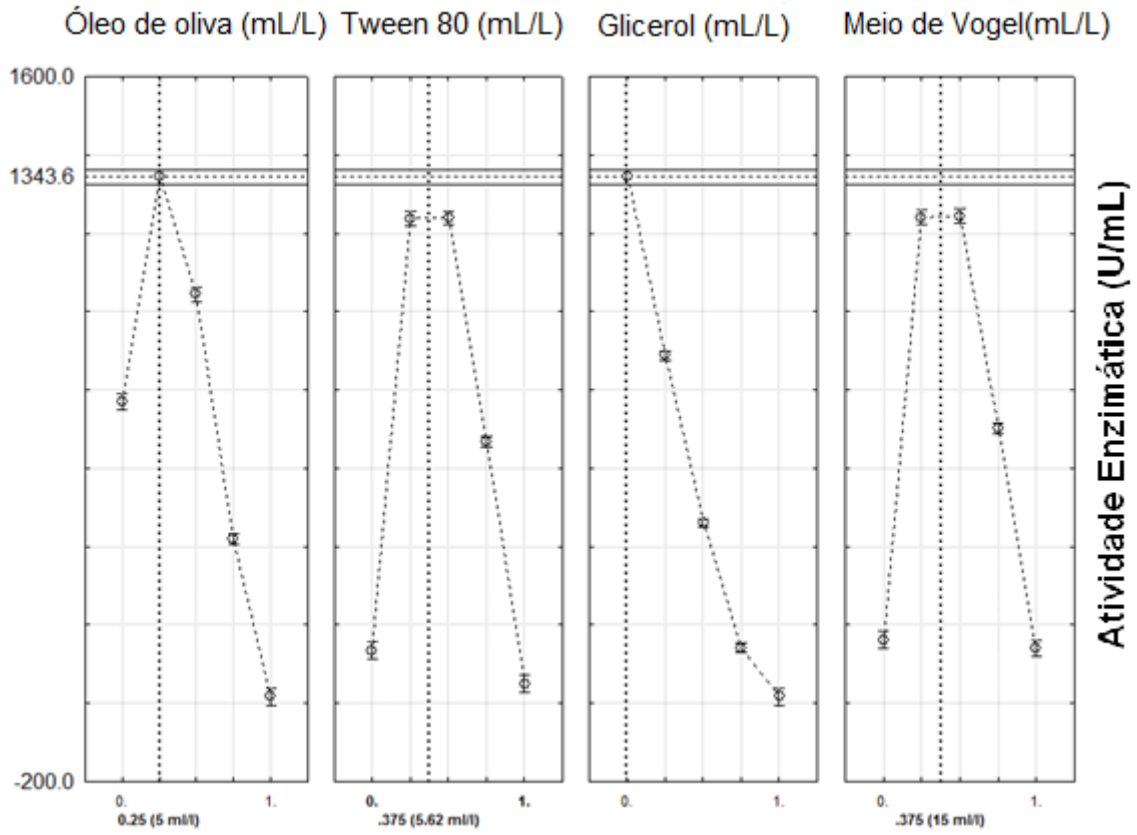
**Tabela 2** - Análise de regressão das variáveis e suas interações na produção de lipase de *T. koningii* em efluente de laticínio.

Componentes	Coefficientes	Erro Padrão	t-valor	p-valor
Óleo de oliva ( $X_1$ )	16,64	6,81	2,44	0,092
Tween 80 ( $X_2$ )	50,12	6,81	7,36	0,005
Glicerol ( $X_3$ )	17,20	6,81	2,53	0,086
Meio de Vogel ( $X_4$ )	140,74	6,81	20,68	0,0002
$X_1X_2$	524,19	33,15	15,81	0,0006
$X_1X_3$	64,63	33,15	1,95	0,146
$X_1X_4$	183,63	33,15	5,54	0,012
$X_2X_3$	- 92,09	33,15	-2,78	0,069
$X_2X_4$	2.698,39	33,15	81,39	0,000004
$X_3X_4$	- 113,45	33,15	-3,42	0,042
$X_1X_2X_3$	5.158,64	211,18	24,43	0,0001
$X_1X_2X_4$	23.381,60	211,18	110,72	0,000002
$X_1X_3X_4$	462,17	211,18	2,19	0,116
$X_2X_3X_4$	8.418,95	211,18	39,87	0,00003

$R^2=0,99$ ; falta de ajuste:  $p= 0,99$

**Figuras****Figura 1** - Superfície de contorno da produção de lipase por *T. koningii* para a interação ternária do óleo de oliva, Tween 80 e meio de Vogel.

**Figura 2** - Gráfico de otimização da produção de lipase por *T. koningii* dos componentes óleo de oliva, Tween 80, glicerol e meio de Vogel.



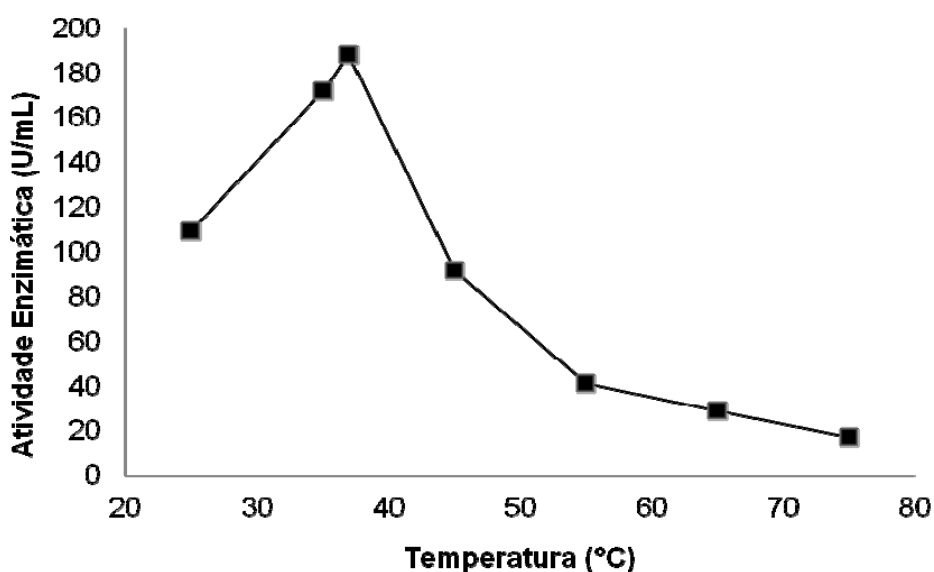
### 5.3 RESULTADOS COMPLEMENTARES

#### 5.3.1 Caracterização Parcial do Extrato Bruto Enzimático

##### 5.3.1.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade de lipase

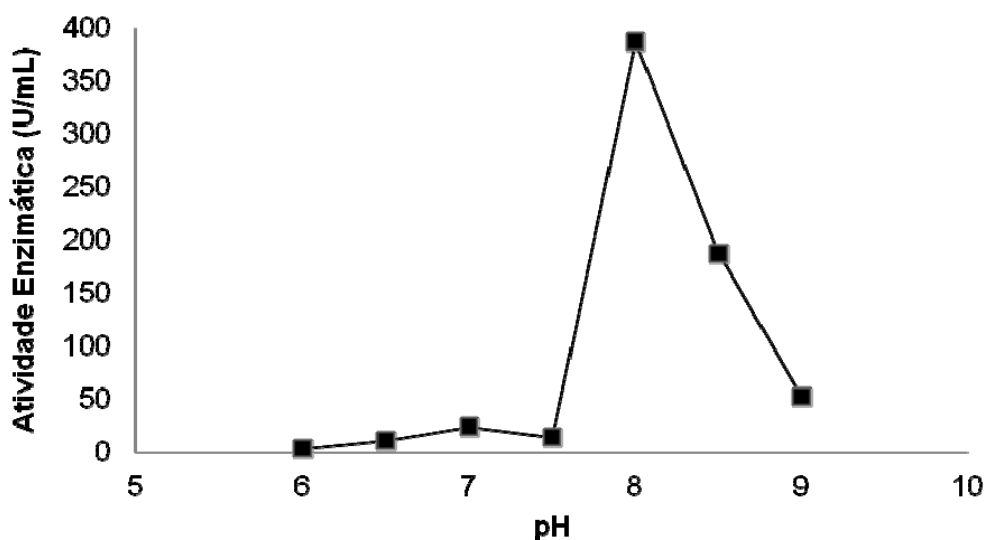
A temperatura ótima da atividade de lipase foi observada em 37 °C (Figura 1). Resultados similares foram obtidos pelo extrato bruto enzimático de *Penicillium* sp. (WOLSKI et al., 2009). Vários estudos verificaram a temperatura ótima entre 30 a 40 °C (JI et al., 2010; LI et al., 2011b; LIU et al., 2008; MOHAMED et al., 2011). A enzima demonstrou boa termoestabilidade, mantendo aproximadamente 80 % de sua atividade na faixa de 45 a 65 °C. Entretanto, a 75 °C por 2 horas ocorreu sua inativação. A estabilidade térmica apresentada pelo extrato enzimático de *T. koningii* é melhor do que a verificada pela lipase de *Mucor hiemalis*, a qual manteve 50 % de atividade, a 50 °C por 90 minutos (ÜLKER; KARAOĞLU, 2012). A lipase termoestável de *Staphylococcus aureus* manteve 65 % de sua atividade após 1 hora de incubação a 60 e 70 °C (SARKAR et al., 2012).

**Figura 1** – Efeito da temperatura na atividade de lipase do extrato enzimático de *T. koningii* incubado no pH 8,5 por 10 minutos.



O pH 8,0 foi determinado como ótimo na atividade enzimática (Figura 2). A atividade de lipase do extrato bruto demonstrou ser estável na faixa de pH de 3,0 a 8,0 , porém ocorreu uma perda de 18% no pH 9,0. A lipase de *Aureobasidium pullulans* apresentou resultados semelhantes, pH ótimo 8,5 e estabilidade entre o pH 4,0 a 8,5 (LIU; CHI; LI, 2008). A maioria das lipases apresentam pH ótimo alcalino, como as enzimas produzidas por *Ralstonia* sp., pH ótimo de 8,0 a 9,5 (YOO et al., 2011), *Geotrichum* sp., pH ótimo 9,5 (CAI et al., 2009), *Pseudomonas* sp., pH ótimo de 7,5 a 8,0 (YU et al., 2009) e *Thermomyces lanuginosus*, pH ótimo 9,0 (ZHENG et al., 2011). As lipases alcalinas e termoestáveis têm demonstrado grande importância em diferentes aplicações, como em removedores de manchas de gordura (HORCHANI et al., 2009).

**Figura 2** – Efeito do pH na atividade de lipase do extrato enzimático de *T. koningii* incubado a 37 °C, por 10 minutos.



### 5.3.1.2 Efeito de íons metálicos na atividade de lipase

O efeito de íons metálicos foi verificado na atividade residual de lipase (%) de *T. koningii* e somente o  $K^+$  demonstrou um pequeno efeito positivo na atividade enzimática (112,08 %). O íon  $K^+$  também estimulou a lipase de *Geobacillus* sp. (EBRAHIMPOUR et al., 2011). Os íons  $Ca^{+2}$  (82,87 %) e  $Fe^{+3}$  (87,06 %) inibiram levemente a atividade de lipase, enquanto  $Na^+$  (98,97 %) e  $Ba^{+2}$  (97,77 %) não apresentaram efeitos. De modo diferente, vários estudos descreveram que o  $Ca^{+2}$

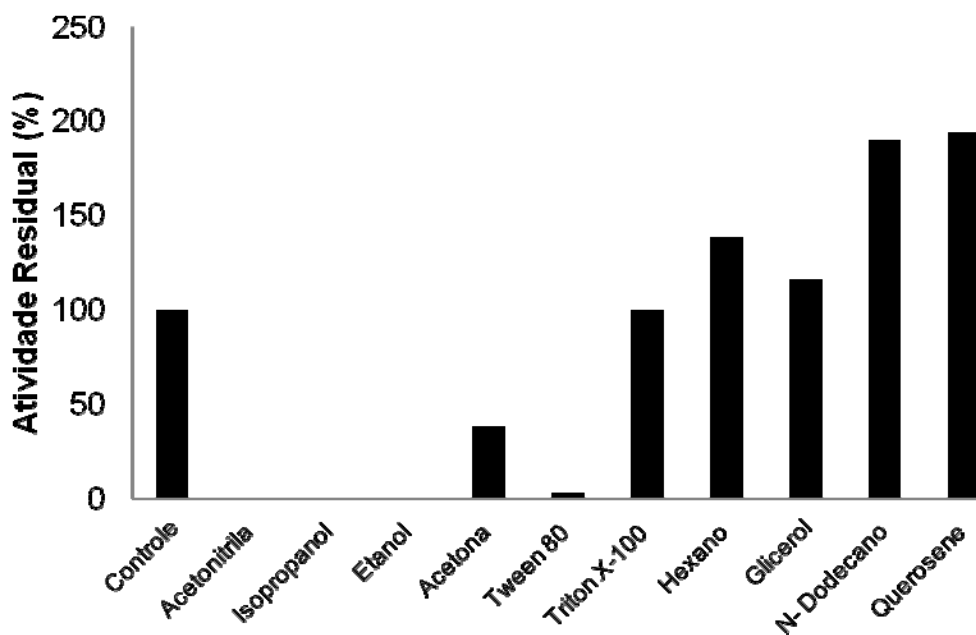
aumentou a atividade da enzima (DANNAVATE et al., 2009; JI et al., 2010; LI et al., 2011b; YOO et al., 2011). Ülker e Karaoğlu (2012) verificaram que  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  inibiram levemente a atividade da lipase de *M. hiemalis*. O íon  $\text{Fe}^{+3}$  aumentou fortemente a atividade da enzima de *M. racemosus*, enquanto  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{K}^+$  não apresentaram efeitos (MOHAMED et al., 2011).

### 5.3.1.3 Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase

O extrato bruto enzimático perdeu atividade principalmente quando incubado nos solventes hidrofílicos, isopropanol, etanol, acetona e acetonitrila. Os solventes hidrofóbicos, hexano, n-dodecano e querosene estimularam a atividade da enzima. As maiores atividades residuais observadas foram 194,24 % (querosene), 190,29 % (n-dodecano) e 139,17 % (hexano) (Figura 3). O efeito estimular de solventes hidrofóbicos e a redução da atividade em solventes hidrofílicos estão de acordo com vários estudos (CADIRCI; YASA, 2010; DHEEMAN et al., 2011; MANDER et al., 2012; ROMERO et al., 2012). A razão para a maior estabilidade da enzima na presença de solventes hidrofóbicos pode ser a superfície de interação do solvente, que causaria a ativação interfacial (RUCHI; ANSHU; KHARE, 2008). A lipase de *Serratia marcescens* apresentou resultados diferentes, demonstrando estabilidade em solventes hidrofílicos como o metanol, isopropanol, acetona e etanol (ZHAO et al., 2008).

Em relação aos detergentes, Tween 80 provocou uma perda de 96,32 % e Triton X-100 não interferiu na atividade de lipase. Do mesmo modo, Castro-Ochoa et al. (2005) verificaram a inativação da lipase de *B. thermoleovorans* quando incubada em Tween 80 e um leve efeito positivo de Triton X-100. Resultados diferentes foram obtidos pela enzima de *Streptomyces* sp., que apresentou aumento de sua atividade quando incubada com Triton X-100, Tween 20 e 80 (MANDER et al., 2012).

**Figura 3** – Efeito de solventes orgânicos e detergentes na atividade de lipase residual (%) do extrato bruto enzimático de *T. koningii*, após 120 minutos de incubação.



## CONCLUSÃO

O novo isolado de *T. koningii* demonstrou ser um promissor produtor de lipase tanto em meio de Vogel como em efluente de lacticínio.

As condições de cultivo em meio de Vogel foram otimizadas e a maior produção da enzima foi 175,20 U/mL, sendo obtida em 10 mL/L de óleo de oliva, 120 horas; 28 °C; pH 6,0 e 105 rpm.

O extrato enzimático produzido foi caracterizado bioquimicamente, apresentando condições ótimas da atividade de lipase em 37 °C e pH 8,0. A enzima demonstrou termoestabilidade até 65 °C, estabilidade em uma ampla faixa de pH (3,0 a 8,0), em íons metálicos e solventes hidrofóbicos.

A composição do efluente de lacticínio utilizado como meio de fermentação foi determinada e apresentou as características: pH 9,0; DQO de 1,376 mg/L; lipídios totais de 70 mg/L; proteínas totais de 189,49 mg/L e açúcares totais de 55,83 mg/L.

*T. koningii* apresentou capacidade de produzir lipase no efluente de lacticínio e a maior produção verificada foi de 1.327,28 U/mL, com o resíduo suplementado com 5 mL/L de óleo de oliva; 5,62 mL/L de Tween 80 e 15 mL/L de meio de Vogel.

A metodologia estatística mostrou ser uma eficiente ferramenta para identificação das variáveis que estimulam na produção de lipase por *T. koningii*.

A alta produção de lipase verificada demonstra a possibilidade da utilização de efluente de lacticínio, um resíduo de baixo custo e rico em compostos orgânicos, como meio de fermentação para a produção de enzimas e outras biomoléculas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; SOLIMAN, N. A.; YOUSEF, S. M.; EL-HELOW, E. R. Application of experimental designs to optimize medium composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus thermodenitrificans* AZ1. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 10, p. 193–200, 2012.
- AHMED, E. H.; RAGHAVENDRA, T.; MADAMWAR, D. An alkaline lipase from organic solvent tolerant *Acinetobacter* sp. EH28: Application for ethyl caprylate synthesis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3628–3634, 2010.
- ÅKERMAN, C. O.; HAGSTRÖM, A. E. V.; MOLLAAHMAD, M. A.; KARLSSON, S.; HATTI-KAUL, R. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimization of trimethylolpropane oleate production. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2225–2231, 2011.
- ARTHAM, T.; MOHANALAKSHMI, N.; PARAGI-VEDANTHI, P. P.; DOBLE, M. Mechanistic investigations of lipase-catalyzed degradation of polycarbonate in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 71–79, 2011.
- BAILEY, M. J.; ADAMITSCH, B.; RAUTIO, J.; VON WEYMARN, N.; SALOHEIMO, M. Use of a growth-associated control algorithm for efficient production of a heterologous laccase in *Trichoderma reesei* in fed-batch and continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 484–491, 2007.
- BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. São Paulo: Ed. UNICAMP, 1996.
- BASHEER, S. M.; CHELLAPPAN, S.; BEENA, P. S.; SUKUMARAN, R. K.; ELYAS, K. K.; CHANDRASEKARAN, M. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 627-38, 2011.
- BORA, L.; BORA, M. Optimization of extracellular thermophilic highly alkaline lipase from thermophilic *Bacillus* sp isolated from hot spring of Arunachal Pradesh, India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 30-42, jan./mar. 2012.
- BORSATO, D.; GUEDES, C. L. B.; MOREIRA, I.; PINTO, J. P.; DIAS, G. H.; SPACINO, K. R. Otimização das condições de obtenção de biodiesel de óleo de soja utilizando o delineamento experimental de mistura. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 3-13, jan./jun., 2010.
- BOX, G.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experiments and introduction to design. Data analysis and model building**. New York: John Wiley, 1976. p. 653
- BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; SAMPEDRO, I.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A.; PETRUCCIOLI, M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3395-3402, 2009.

CADIRCI, B. H.; YASA, I. An organic solvents tolerant and thermotolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* P21. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 155-161, 2010.

CAI, Y.; WANG, L.; LIAO, X.; DING, Y.; SUN, J. Purification and partial characterization of two new cold-adapted lipases from mesophilic *Geotrichum* sp. SYBC WU-3. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 786-790, 2009.

CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P. R. B.; NOFFS, M. A.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D. M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentração de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, Jan./Feb., 2003.

CASTRO-OCHOA, L. D.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, C.; VALERIO-ALFARO, G.; ROS, R. O. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 648-654, 2005.

CIHANGIR, N.; SARIKAYA, E. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 193-197, 2004.

CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures - designs, models and the analysis of mixture data**. 2. ed. New York: John Wiley and Sons, 1990.

COSTA, V. E. U.; AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influencia do solvente. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 863-873, Nov./Dec., 1999.

D'ANNIBALE, A.; BROZZOLI, V.; CROGNALE, S.; GALLO, A. M.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Optimisation by response surface methodology of fungal lipase production on olive mill wastewater. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 1586-1593, 2006a.

D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 828-1833, 2006b.

DALLA-VECCHIA, R.; SEBRAO, D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Carboxymethylcellulose and poly (viny alcohol) used as a filme support for lipases immobilization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2677-2682, 2005.

DAMASO, M. C. T.; PASSIANOTO, M. A.; de FREITAS, S. C.; FREIRE, D. M. G.; LAGO, R. C. A.; COURI, S. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 676-681, 2008.

DANDAVATE, V.; JINJALA, J.; KEHARIA, H.; MADAMWAR, D. Production, partial purification and characterization of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia*

*multivorans* V2 and its application for ester synthesis. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3374-3381, 2009.

DANIELSON, R. M.; DAVEY, C. B. The abundance of *Trichoderma* propagules and the distribution of species in forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 486-494, 1973.

DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S.; SILVA, M. R.; AZZONI, S. F.; PRADELLA, J. G. C. Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 517-521, 2012.

DHEEMAN, D. S.; ANTONY-BABU, S.; FRÍAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Purification and characterization of an extracellular lipase from a novel strain *Penicillium* sp. DS-39 (DSM 23773). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p.256-262, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 9, p. 77-103, 1956.

EBRAHIMPOUR, A.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; BASRI, M.; SALLEH, A. B. High level expression and characterization of a novel thermostable, organic solvent tolerant, 1,3-regioselective lipase from *Geobacillus* sp. strain ARM. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6972-6981, 2011.

FANG, Y.; LU, Y.; LV, F.; BIE, X.; ZHAO, H.; WANG, Y.; LU, Z. Improvement of alkaline lipase from *Proteus vulgaris* T6 by directed evolution. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 84-88, 2009.

FARIZOGLU, B. UZUNER, S. The investigation of dairy industry wastewater treatment in a biological high performance membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 57, p. 46-54, 2011.

FEDOSOV, S. N.; BRASK, J.; PEDERSENC, A. K.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M.; XU, X. Kinetic model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 156-168, 2013.

FLORES, S. K. COSTA, D. YAMASHITA, F. GERSCHENSON, L. N. GROSSMANN, M. V. Mixture design for evaluation of potassium sorbate and xanthan gum effect on properties of tapioca starch films obtained by extrusion. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p.196-202, 2010.

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.

GIESE, E. C.; DEKKER, R. F.H.; SCARMINIO, I. S.; BARBOSA, A. M.; da SILVA, R. Comparison of  $\beta$ -1,3-glucanase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and

*Trichoderma harzianum* Rifai and its optimization using a statistical mixture-design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 239-243, 2011.

GUNCHEVA, M.; TASHEV, E.; ZHIRYAKOVA, D.; TOSHEVA, T.; TZOKOVA, N. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on novel phosphorous-containing polyurethanes: Application in wax ester synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 923-930, 2011.

GUPTA N.; MEHRA, G.; GUPTA, R. A glycerol-inducible thermostable lipase from *Bacillus* sp.: medium optimization by a Plackett–Burman design and by response surface methodology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 361-368, 2004.

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

HARMAN, G. E. Overview of mechanism and use of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, p. 90-194, 2006.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HARTREE, E. F. Determination of Protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. **Annals of Microbiology**, v. 56, p. 247-252, 2006.

HASAN-BEIKDASHTI, M.; FOROOTANFAR, H.; SAFIARIAN, M.S.; AMERI, A.; GHAHREMANI, M.H.; KHOSHAYAND, M.R.; FARAMARZI, M.A. Optimization of culture conditions for production of lipase by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 670-677, 2012.

HE, Y-Q.; TAN, T-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, p. 9-14, 2006.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, B.; CORDOVA, J.; BARZANA, E.; FAVELA-TORRES, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, p. 136-142, 2009.

H-KITTIKUN, A.; KAEWTHONG, W.; CHEIRSILP, B. Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized lipase PS. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 116–120, 2008.

HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 237-245, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal– 2010**. Disponível em:

<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2002>>. Acesso em: 27 mar. 2013.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W., REETZ, M. T. Bacterial biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications of lipases. **Annual Review Microbiology**, v. 53, p. 15-351, 1999.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Tibtech**, v. 16, p. 396-403, 1998.

JI, Q. XIAO, S. HE, B. LIU, X. Purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 264-269, 2010.

KANTAK, J. B.; BAGADE, A. V.; MAHAJAN, S. A.; PAWAR, S. P.; SHOUCHE, Y. S.; PRABHUNE, A. A. Isolation, identification and optimization of a new extracellular lipase producing strain of *Rhizopus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, p. 969–978, 2011.

KASHMIRI, M. A.; ADNAN, A.; BUTT, B. W. Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma Viride*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 878-882, 2006.

KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R.K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 121–126, 2006.

KUMAR, R.; MAHAJAN, S.; KUMAR, A.; SINGH, V. Identification of variables and value optimization for optimum lipase production by *Bacillus pumilus* RK31 using statistical methodology. **New Biotechnology**, v.28, n.1, p.187-192, 2011a.

KUMAR, S.; KATIYAR, N.; INGLE, P.; NEGI, S. Use of evolutionary operation (EVOP) factorial design technique to develop a bioprocess using grease waste as a substrate for lipase production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4909–4912, 2011b.

KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**, v. 41, p. 38–44, 2005.

LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 216, p. 155-160, 1993.

LI, H.; ZHANG, X. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. *TW1*. **Protein Expression and Purification**, v.42, p. 153–159, 2005.  
LI, N.; ZONG, M-H. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 43–54, 2010.

LI, S.; PANG, H.; LIN, K.; XU, J.; ZHAO, J.; FAN, L.; Refolding, purification and characterization of an organic solvent-tolerant lipase from *Serratia marcescens* ECU1010. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, p. 171-176, 2011a.

LI, Z.; LI, X.; WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, F.; JIANG, J. Expression and characterization of recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9810–9813, 2011b.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 65–71, 2004.

LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Lipase Production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technology Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 105–110, 2003.

LIN, E-S.; WANG, C-C.; SUNG; S-C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98–102, 2006.

LIN, Y.; CHEN, G.; LING, M.; LIANG, Z. A method of purification, identification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma koningii* AS3.2774. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, p. 74–81, 2010.

LIU, C-H.; CHEN, C-Y.; WANG, Y-W.; CHANG, J-S. Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. **Biochemical Engineering Journal**, v.58– 59, p. 96– 102, 2011.

LIU, C-H.; HUANG, C-C.; WANG, Y-W.; CHANG, J-S. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 43, p. 511-516, 2012.

LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 445–451, 2008.

MAFAKHER, L.; MIRBAGHERI, M.; DARVISHI, F.; NAHVI, I.; ZARKESH-ESFAHANI, H.; EMTIAZI, G. Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. **New Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 337-340, 2010.

MAGANHA, M.F.B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo: CETESB, 2006.

MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 147–151, 2012.

MANDER, P.; CHO, S. S.; SIMKHADA, J. R.; CHOI, Y. H.; PARK, D. J.; YOO, J. C. An organic solvent-tolerant lipase from *Streptomyces* sp. CS133 for enzymatic transesterification of vegetable oils in organic media. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 635–642, 2012.

MESSIAS, J. M.; da COSTA, B. Z.; de LIMA, V. M. G.; DEKKER, R. F. H.; REZENDE, M. I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A. M. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426–431, 2009.

MHETRAS, N.C; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V. Purification and characterization of acidic lipase from *Trichoderma* sp. NCIM 1207. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1486–1490, 2009.

MOHAMED, S. A.; ABDEL-MAGEED, H. M.; TAYEL, S. A.; EL-NABRAWI, M. A.; FAHMY, A. S. Characterization of *Mucor racemosus* lipase with potential application for the treatment of cellulite. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 642–648, 2011.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**, 5. ed. New York : John Wiley and Sons, 2001.

MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1723, p. 282– 291, 2005.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2. ed. John Wiley and Sons, New York, 2002.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 612–619, 2003.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 413-420, 2013.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAULIUKAITE, R.; DOHERTY, A. P.; MURNAGHAN, K. D.; BRETT, C. M. A. Application of room temperature ionic liquids to the development of electrochemical lipase biosensing systems for water-insoluble analytes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 656, p. 96–101, 2011.

PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; de OLIVEIRA, D. TREICHEL, H. DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 444-450, 2008.

RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical experimental design for evaluation of medium components for lipase production by *Rhizopus arrhizus* MTCC 2233. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 985–992, 2009.

RAMANI, K.; KENNEDY, L. J.; RAMAKRISHNAN, M.; SEKARAN, G. Purification, characterization and application of acidic lipase from *Pseudomonas gessardii* using beef tallow as a substrate for fats and oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1683–1691, 2010.

RIGO, E.; NINOW, J. L.; DI LUCCIO, M.; OLIVEIRA, J. V.; POLLONI, A. E.; REMONATTO, D.; ARBTER, F.; VARDANEGA, R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplements. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 1132-1137, 2010.

ROMDHANE, I. B-B.; FENDRI, A.; GARGOURI, Y.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 112–120, 2010.

ROMERO, C. M.; PERA, L. M.; LOTO, F.; VALLEJOS, C.; CASTRO, G.; BAIGORI, M. D. Purification of an organic solvent-tolerant lipase from *Aspergillus niger* MYA 135 and its application in ester synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 25–31, 2012.

RUCHI, G.; ANSHU, G.; KHARE, S. K. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4796–4802, 2008.

SALIHU, A.; ALAM, Md. Z.; ABDULKARIM, M. I. SALLEH, H. M. Optimization of lipase production by *Candida cylindracea* in palm oil mill effluent based medium using statistical experimental design. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 66–73, 2011a.

SALIHU, A.; ALAM, Md. Z.; ABDULKARIM, M. I.; SALLEH, H. M. Effect of process parameters on lipase production by *Candida cylindracea* in stirred tank bioreactor

using renewable palm oil mill effluent based medium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 187–192, 2011b.

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. **Mycological Research**, v. 8, p. 923-935, 1996.

SARKAR, P. YAMASAKI, S. BASAK, S. BERA, A. BAGA, P. K. Purification and characterization of a new alkali-thermostable lipase from *Staphylococcus aureus* isolated from *Arachis hypogaea* rhizosphere. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 858–866, 2012.

SÁNCHEZ-OTERO, M. G.; RUIZ-LÓPEZ, I. I.; ÁVILA-NIETO, D. E.; OLIART-ROS, R. M. Significant improvement of *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 thermoalkalophilic lipase production using Response Surface Methodology. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 761-766, 2011.

SANTIS-NAVARRO, A.; GEA, T.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Production of lipases by solid state fermentation using vegetable oil-refining wastes. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10080–10084, 2011.

SEABRA, I. J. BRAGA, M. E. M. DE SOUSA, H. C. Statistical mixture design investigation of CO<sub>2</sub>–Ethanol–H<sub>2</sub>O pressurized solvent extractions from tara seed coat. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 64, p. 9–18, 2012.

SHARMA, A.; BARDHAN, D.; PATEL, R. Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, p. 179-183, 2009.

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

SILVA, W. O. B.; MATIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 321-326, 2005.

STERGIOU, P-Y.; FOUKIS, A.; SKLIVANITI, H.; ZACHARAKI, P.; PAPAGIANNI, M.; PAPAMICHAEL, E. M. Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 672–680, 2012.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 459-465, 2003.

TAYYAB, M.; RASHID, N.; AKHTAR, M. Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 272–278, 2011.

TURKI, S.; KRAEIM, I. B.; WEECKERS, F.; THONART, P.; KALLEL, H.M Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2724–2731, 2009.

ÜLKER, S.; KARAOĞLU, Ş. A. Purification and characterization of an extracellular lipase from *Mucor hiemalis* f. *corticola* isolated from soil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 4, p. 385-390, 2012.

ÜLKER, S.; ÖZEL, A.; ÇOLAK, A.; KARAOĞLU, Ş. A. Isolation, production, and characterization of an extracellular lipase from *Trichoderma harzianum* isolated from soil. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 543-550, 2011.

VERDUGO, C.; LUNA, D.; POSADILLO, A.; SANCHO, E. D.; RODRÍGUEZ, S.; BAUTISTA, F.; LUQUE, R.; MARINAS, J. M.; ROMERO, A. A. Production of a new second generation biodiesel with a low cost lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*: Optimization by response surface methodology. **Catalysis Today**, v. 167, p. 107–112, 2011.

VERGER, R. Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. **Tibtech**, v.15, p.32-38, 1997.

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

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

VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. **Desalination**, v. 219, p. 190–202, 2008.

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**, v.41, p.30–37, 2008.

WANG, W-F.; LI, T.; QIN, X-LI.; NING, Z-X.; YANG, B.; WANG, Y-H. Production of lipase SMG1 and its application in synthesizing diacylglycerol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 77, p. 87– 91, 2012.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D.; WALLER, J. E. Interspecific competitive interactions between pairs of fungal species in natural substrates. **Oecologia**, v. 94, p. 165-172, 1993.

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

WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; DI LUCCIO, M.; de OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 1557–1560, 2009.

WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. **Phytopathology**, v. 96, p. 181–185, 2005.

YADAV, K. N. S.; ADSUL, M. G.; BASTAWDE, K. B.; JADHAV, D.D.; THULASIRAM, H. V.; GOKHALE, D. V. Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10663–10670, 2011.

YA-HONG, X.; JIAN-ZHONG, L.; HAI-YAN, S.; LIANG-NIAN, J. Enhanced production of extracellular ribonuclease from *Trichoderma* sp. by optimization of culture conditions using response surface methodology. **Journal of Biochemistry Engineer**, v. 21, p. 27–32, 2004.

YOO, H-Y.; SIMKHADA, J. R.; CHO, S. S.; PARK, D. H.; KIM, S. W.; SEONG, C. N.; YOO, J. C. A novel alkaline lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102, p. 6104–6111, 2011.

YU, H-W.; HAN, J.; LI, N.; QIE, X-S.; JIA, Y-M. Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip35. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 8, p. 956-962, 2009.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v.42, p.384–391, 2007.

ZHANG, C.; WONG, W. K. Optimal designs for mixture models with amount constraints. **Statistics and Probability Letters**, v. 83, p. 196–202, 2013.

ZHANG, K-P.; LAI, J-Q.; HUANG, Z-L.; YANG, Z. *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2767–2772, 2011.

ZHANG, L.; LIU, Y.; NIU, X.; LIU, Y.; LIAO, W. Effects of acid and alkali treated lignocellulosic materials on cellulase/xylanase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 and corresponding enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 16-24, 2012.

ZHAO, L-L. XU, J-H. ZHAO, J. PAN, J. WANG, Z-L. Biochemical properties and potential applications of an organic solvent tolerant lipase isolated from *Serratia marcescens* ECU1010. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 626–633, 2008.

ZHENG, Y-Y.; GUO, X-H.; SONG, N-N.; LI, D-C. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, p. 127–132, 2011.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Normas para a submissão do artigo para o periódico *Brazilian Journal of Microbiology*.

### Submissão de um artigo

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

### Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

### ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>) devem ser respeitados.

### Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

*Artigos Originais e Artigos de revisão* deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências tabelas e figuras.

*Notas prévias* devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Comission (Comission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that...Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

## SUGESTÕES DE REVISORES

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

## ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e

País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas seqüencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *BIOSIS*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

#### **a. Artigos de Periódicos**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

#### **b. Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In*: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.

#### **c. Livros**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

#### **d. Patentes**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

### e. Teses e Dissertações

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

### f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

### g. Publicações na Web

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

### h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como “personal communication” ou “unpublished data” devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são “aceitos para publicação” ou “no prelo”. No entanto, referências de artigos que são “submetidos” ou “em preparo” não são aceitas.

**AGRADECIMENTOS:** Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

**TABELAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

### **Conflitos de Interesses**

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

### **DIREITOS AUTORAIS**

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

## ANEXO B

Normas para a submissão do artigo para o periódico Journal of Molecular Catalysis

B: Enzymatic.

### Introduction

The journal is an international forum devoted to research and developments in the applications of whole-cell and cell-free enzymes as catalysts in organic synthesis. Emphasis is focused on mechanistic and synthetic aspects of the biocatalytic transformation.

Papers should report novel and significant advances in one or more of the following topics;

- Applied and fundamental studies of enzymes used for biocatalysis;
- Industrial applications of enzymatic processes, e.g. in fine chemical synthesis;
- Chemo-, regio- and enantioselective transformations;
- Screening for biocatalysts;
- Integration of biocatalytic and chemical steps in organic syntheses;
- Novel biocatalysts, e.g. enzymes from extremophiles and catalytic antibodies;
- Enzyme immobilization and stabilization, particularly in non-conventional media;
- Bioprocess engineering aspects, e.g. membrane bioreactors;
- Improvement of catalytic performance of enzymes, e.g. by protein engineering or chemical modification;
- Structural studies, including computer simulation, relating to substrate specificity and reaction selectivity;
- Biomimetic studies related to enzymatic transformations.

### Types of Paper

The journal publishes three types of papers:

1. Full-length, or regular papers describing original research work not previously published.
2. Reviews of specialized topics within the scope of the Journal (prospective authors should obtain preliminary approval from an Editor before preparing such an article); short reviews on enzymatic processes will be considered.
3. Letters reporting results which should be made rapidly available to other researchers in the field. They should consist of concise descriptions or brief reports of investigations. They may be completely documented (description of experimental procedure, reference to literature, etc.). Letters will be considered for publication only if they report on new reactions, catalysts or mechanisms, and are a maximum of 4 printed pages in length. The authors are requested to indicate, in a covering letter, the reasons which justify the publication of their results as a Letter.

### Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

## Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

## Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

## Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including

abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Open access**

This journal does not ordinarily have publication charges; however, authors can now opt to make their articles available to all (including non-subscribers) via the ScienceDirect platform, for which a fee of \$3000 applies (for further information on open access see <http://www.elsevier.com/about/open-access/open-access-options>). Please note that you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication, to avoid any perception of conflict of interest. The fee excludes taxes and other potential costs such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

## Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> or visit our customer support site <http://support.elsevier.com> for more information.

## Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://ees.elsevier.com/molcab/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

## Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## Preparation

### Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

## Article structure

### ***Subdivision - numbered sections***

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should

be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### ***Introduction***

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### **Experimental**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### ***Results***

Results should be clear and concise.

### ***Discussion***

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

A short conclusions section is to be presented.

### ***Appendices***

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in

the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

### **Graphical abstract**

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### **Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract

must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## **Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## **Nomenclature and Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) <http://www.iupac.org/> for further information.

## **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### *Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## **Artwork**

### ***Electronic artwork***

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

**Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

**Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

**Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

**References**

**Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results'

or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Reference management software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

### **Reference style**

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing, Inc. New York, 2009, pp. 281–304.

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts

Service): <http://www.cas.org/content/references/corejournals>.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the

video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect:<http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

After Acceptance

### **Use of the Digital Object Identifier**

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### **Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### **Offprints**

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint

order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com//myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com//myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>)

#### Author Inquiries

##### Author

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.